# UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

# EFECTO DEL RESIDUO DE ENROFLOXACINA EN EL CULTIVO DE ALFALFA (*Medicago sativa*) Y EN EL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN SUELO

**TESIS**

**Presentado por:**

Oscar Duberly Vera Loayza

**Asesor:** Franz Zirena Vilca

**Para optar el título profesional de:**

INGENIERO AMBIENTAL

**MOQUEGUA – PERÚ**

**2022**

UNAM
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AMBIENTAL

Folio Nº 021

# ACTA DE SUSTENTACIÓN

I. Modalidad:

Tesis : [X]
Trabajo de Suficiencia Profesional : [ ]
Otro: ..... : [ ]

II. Documento de aprobación para la sustentación:

RESOLUCIÓN DE FACULTAD N°- 031 - 2022 - FACIA - UNAM

Fecha: 06/ABRIL/2022

III. El jurado ha dictaminado la (el) TESIS, TITULADO:

"EFECTO DEL RESIDUO DE ENROFLOXACINA EN EL CULTIVO DE LA ALFALFA (Medicago sativa) Y EN EL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN SUELO"

Bachiller: OSCAR DUBERLY VERA LOAYZA

Asesor Principal: Dr. FRANZ ZIRENA VILCA

Co-Asesor: .....

IV. Se dictamina:

Como: APROBADO por UNANIMIDAD la sustentación de manera:

Presencial [x] Virtual [ ]

Con nota: CATORCE (14) por lo que; Sí [x] No [ ]

Opta el Título Profesional de INGENIERO AMBIENTAL.

Siendo las 13:20 horas, del 25 de ABRIL del año 2022 se procede con la firma en conformidad de lo dictaminado por el Jurado.

René Germán Sosa Vilca
Presidente

Primer Miembro
Dr. Hebert Hernán Soto G.

Segundo Miembro
José Antonio Valeriano Zapana

Oscar Duberly Vera Loayza
Bachiller 46540035

**Dedicatoria:**

A la que es madre y padre, mi madre Lucy, que me demostró que a pesar de que la vida te golpee fuerte, siempre nos podemos levantar y perseverar, y a la que fue mi segunda madre, mi abuelita Juana, que me enseño que lo más importante es la familia y me hubiera gustado que viera este logro, la extrañaré hasta el día de mi muerte. También dedico esto a los animalitos que algún día podre cuidar.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Moquegua por haberme permitido mi formación universitaria, además de darme la oportunidad de realizar mi tesis con el financiamiento por canon minero y regalías mediante concurso a nivel de docente.

A los docentes de la escuela profesional de Ingeniería Ambiental que acompañaron y fueron participe en mi camino universitario, cuyos cursos fueron un desafío y motivo de superación.

Al Dr. Franz Zirena Vilca por haber sido mi asesor y haberme brindado la oportunidad de participar en proyectos de investigación, además de haberme dado la motivación y el empujón que muchas veces necesité para conseguir este logro.

Al Dr. Valdemar Luiz Tornisielo que permitió el desarrollo de esta tesis en el Laboratorio de Ecotoxicología del CENA de la Universidad de Sao Paulo.

A mi familia que me apoyó en mi etapa universitaria y que, hasta el día de la sustentación de la presente tesis, desconocían del tema.

También agradezco a esa persona que estuvo a mi lado en el desarrollo de esta tesis, que me apoyo en los momentos de preocupación y ansiedad, la que fue mi compañera, amiga y más; A.T.

Y por último, pero no menos importante, me agradezco a mí, por muchas veces haber querido tirar la toalla, por haberme levantado de las caídas, por lo cursos desaprobados, por los muchos cursos aprobados, por las desveladas, por las preocupaciones, por las alegrías, por haber decidido iniciar algo diferente y por haber confiado en que podría lograrlo; por eso y más, gracias.

**TÍTULO**

EFECTO DEL RESIDUO DE ENROFLOXACINA EN EL CULTIVO DE ALFALFA (*Medicago sativa*) Y EN EL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN SUELO

**NOMBRE DEL AUTOR**

OSCAR DUBERLY VERA LOAYZA

**RESUMEN**

Los antibióticos de amplio espectro son utilizados para tratar y prevenir enfermedades en el ganado que sirve de sustento para la población, sin embargo, los antibióticos administrados al ganado no son asimilados completamente, llegando al suelo por medio de las heces y orina; la enrofloxacina como antibiótico de amplio espectro, presenta un efecto bactericida frente a los microorganismos benéficos que facilitan la fijación de nutrientes y por consiguiente la presencia de enrofloxacina en suelo podría afectar de manera negativa al crecimiento de la alfalfa (*M. sativa*). Por ello, se evaluó el efecto del antibiótico en muestras de alfalfa cultivadas en macetas que fueron regadas con diferentes concentraciones de enrofloxacina (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$) separando a un grupo denominado testigo que estuvo libre de antibiótico. Se contabilizó la cantidad de nódulos formados en raíz realizando una limpieza previa donde se retiró el suelo de las muestras de alfalfa, se realizó el pesado de las muestras de alfalfa para determinar el efecto del antibiótico en el desarrollo de la planta, posterior a ello se evaluó la cantidad de carbono contenido en alfalfa utilizando el equipo espectrómetro de masas, también se determinó la cantidad de nitrógeno en suelo para evaluar la diferencia entre el grupo testigo libre de antibiótico con las muestras a las que se les aplicó las diferentes concentraciones de enrofloxacina. En base al análisis estadístico ANOVA de un factor, se realizó la evaluación de la cantidad de nódulos que se desarrollaron en macetas con presencia de enrofloxacina a diferentes concentraciones (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$), donde el grupo testigo logró formar un promedio de 520 ± 141.5 unidades, viéndose reducida esa cantidad a 86 ± 20.3, 89.5 ± 37.5 y 44 ± 14.1 unidades luego de la aplicación de enrofloxacina (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente). La biomasa aérea no presentó una reducción significativa en contraparte con la biomasa radicular que se redujo de un promedio de 7.3990 ± 1.2 gramos (grupo testigo) a 2.2357 ± 0.8, 2.8780 ± 1.8 y 1.8697 ± 0.8 gramos luego de

aplicar las diferentes concentraciones del antibiótico (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente), lo que indica una deficiencia en el crecimiento radicular y a la larga esto traería como consecuencia un débil soporte de partículas de suelo pudiendo provocar erosiones. La evaluación del carbono en alfalfa presentó una reducción que va de 426.82 ± 5.1 g $Kg^{-1}$ (testigo) a 407.3567 ± 11.0, 412.1850 ± 11.3 y 400.6467 ± 6.8 g $Kg^{-1}$ (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) y en base al análisis estadístico esta reducción sería significativa lo que sugiere que la presencia de enrofloxacina puede interferir en el proceso que se lleva a cabo para la fotosíntesis ya que, estudios previos indican que perturbaciones en el sistema de la planta provocaría que ésta cierre sus estomas, reduciendo la captación de carbono atmosférico; por parte del nitrógeno contenido en suelo, no presentó disminución luego de aplicar el antibiótico ya que el análisis de varianza de un factor indicaría que el cambio de datos que va de 1.7900 ± 0.4 g $Kg^{-1}$ (testigo) a 1.9700 ± 0.1, 1.9367 ± 0.3 y 2.0333 ± 0.3 g $Kg^{-1}$ (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) no sería significativa, cabe resaltar que la captación de nitrógeno es favorecido por la formación de nódulos que realiza la leguminosa y el microorganismo *Rhizobium sp.* por lo que, las muestras a las que se les aplicó el antibiótico no pudieron aprovechar eficientemente el nitrógeno. Esto concluye en que el efecto de la presencia de enrofloxacina en suelo puede reducir la cantidad de nódulos formados, reducir la biomasa radicular e interferir en la captación del carbono en alfalfa (*M. sativa*).

**Palabras clave:** enrofloxacina en suelo, simbiosis leguminosa-rizobio, nódulos-alfalfa.

**ABSTRACT**

Broad-spectrum antibiotics are used to treat and prevent diseases in livestock, however, antibiotics administered to livestock are not completely assimilated, reaching the soil through feces and urine; enrofloxacin as a broad-spectrum antibiotic, has a bactericidal effect against beneficial microorganisms that facilitate nutrient fixation and therefore the presence of enrofloxacin in soil could negatively affect the growth of alfalfa (*M. sativa*). Therefore, the effect of the antibiotic was evaluated in alfalfa samples grown in pots that were irrigated with different concentrations of enrofloxacin (2, 20 and 200 µg $L^{-1}$) separating a group called control that was free of antibiotic. The amount of nodules formed in the root was counted by performing a previous cleaning where the soil was removed from the alfalfa samples, the alfalfa samples were weighed to determine the effect of the antibiotic on the development of the plant, then the amount of carbon contained in alfalfa was evaluated using the mass spectrometer equipment, the amount of nitrogen in the soil was also determined to evaluate the difference between the control group free of antibiotic with the samples to which the different concentrations of enrofloxacin were applied. Based on a one-factor ANOVA statistical analysis, the number of nodules that developed in pots with the presence of enrofloxacin at different concentrations (2, 20 and 200 µg $L^{-1}$) was evaluated, where the control group formed an average of 520 ± 141.5 units, and this number was reduced to 86 ± 20.3, 89.5 ± 37.5 and 44 ± 14.1 units after the application of enrofloxacin (2, 20 and 200 µg $L^{-1}$ respectively). The aerial biomass did not show a significant reduction in contrast with the root biomass that was reduced from an average of 7.3990 ± 1.2 grams (control group) to 2.2357 ± 0.8, 2.8780 ± 1.8 and 1.8697 ± 0.8 grams after applying the different concentrations of the antibiotic (2, 20 and 200 µg $L^{-1}$ respectively), which indicates a deficiency in root growth and in the long run this would result in a weak support of soil particles and could cause erosion. The evaluation of carbon in alfalfa showed a reduction from 426.82 ± 5.1 g Kg-1 (control) to 407.3567 ± 11.0, 412.1850 ± 11.3 and 400.6467 ± 6. 8 g Kg-1 (2, 20 and 200 µg $L^{-1}$ respectively) and based on statistical analysis this reduction would be significant suggesting that the presence of enrofloxacin may interfere in the process carried out for photosynthesis since, previous studies indicate that disturbances in the plant system would cause the plant to close its stomata, reducing the uptake of atmospheric carbon; The nitrogen content in the soil did not decrease after applying

the antibiotic, since the analysis of variance of one factor would indicate that the change in data ranging from 1. 7900 ± 0.4 g $Kg^{-1}$ (control) to 1.9700 ± 0.1, 1.9367 ± 0.3 and 2.0333 ± 0.3 g $Kg^{-1}$ (2, 20 and 200 µg $L^{-1}$ respectively) would not be significant, it should be noted that nitrogen uptake is favored by the formation of nodules by the legume and the microorganism *Rhizobium sp*. so that the samples to which the antibiotic was applied could not efficiently take advantage of nitrogen. This concludes that the effect of the presence of enrofloxacin in soil can reduce the amount of nodules formed, reduce root biomass and interfere with carbon sequestration in alfalfa (*M. sativa*).

**Keywords:** enrofloxacin in soil, legume-rhizobia symbiosis, nodules-alfalfa.

**ÍNDICE GENERAL**

PÁG.

I. INTRODUCCIÓN ..... 15
1.1. Descripción y formulación del problema ..... 15
1.2. Formulación del problema ..... 17
1.2.1. Problema general ..... 17
1.2.2. Problemas específicos ..... 17
1.3. Objetivos ..... 17
1.3.1. Objetivo general ..... 17
1.3.2. Objetivos específicos ..... 18
1.4. Justificación e importancia ..... 18
1.5. Hipótesis ..... 19
1.5.1. Hipótesis general ..... 19
1.5.2. Hipótesis específicas ..... 19
II. MARCO TEÓRICO ..... 20
2.1. Antecedentes ..... 20
2.2. Bases teóricas sobre el tema de investigación ..... 24
III. METODOLOGÍA ..... 39
3.1. Tipo y nivel de investigación ..... 39
3.1.1. Tipo de investigación ..... 39
3.1.2. Nivel de investigación ..... 39
3.2. Ámbito temporal y espacial ..... 40
3.3. Población y muestra ..... 41
3.4. Instrumentos ..... 41
3.4.1. Insumos ..... 41
3.4.2. Materiales ..... 42
3.4.3. Equipos ..... 42
3.5. Procedimiento ..... 43
3.5.1. Ajuste de pH del suelo ..... 44
3.5.2. Inoculación y proceso de crecimiento de alfalfa ..... 46
3.5.3. Determinación de nódulos en raíz de alfalfa ..... 47
3.5.4. Determinación de biomasa de alfalfa ..... 50
3.5.5. Determinación de carbono total en alfalfa ..... 51
3.5.6. Determinación de nitrógeno acumulado ..... 53

3.6. Análisis de datos ..... 54
IV. RESULTADOS ..... 55
4.1. Cantidad de nódulos en raíz ..... 56
4.2. Masa radicular y aérea en condición fresco ..... 60
4.2.1. Masa aérea ..... 60
4.2.2. Masa radicular ..... 62
4.2.3. Longitud de raíz en alfalfa ..... 65
4.3. Carbono total en alfalfa ..... 68
4.3.1. Carbono total en hojas ..... 68
4.3.2. Carbono total en raíz ..... 72
4.4. Nitrógeno acumulado en suelo ..... 74
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS ..... 76
5.1. Efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de nódulos producidos en raíz de alfalfa ..... 76
5.2. Efecto del residuo de Enrofloxacina en la producción de biomasa fresca aérea y radicular de alfalfa ..... 78
5.3. Efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de carbono total en alfalfa ..... 80
5.4. Efecto del residuo de enrofloxacina en el nitrógeno total acumulado en suelo ..... 83
VI. CONCLUSIÓN ..... 84
VII. RECOMENDACIONES ..... 85
VIII. REFERENCIAS ..... 86
ANEXOS ..... 96
ANEXO 1: PROCEDIMIENTO EN LABORATORIO ..... 97
ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ..... 105

**ÍNDICE DE TABLAS**

PÁG.

Tabla 1: Representación de variables ..... 40
Tabla 2: Diseño experimental ..... 44
Tabla 3: Resultados del efecto de diferentes concentraciones de enrofloxacina (ENR) (fuente propia) ..... 56
Tabla 4: Resultados de nódulos en raíz (fuente propia) ..... 56
Tabla 5: ANOVA - nódulos en raíz (fuente propia) ..... 57
Tabla 6: Prueba post hoc - nódulos en raíz (fuente propia) ..... 59
Tabla 7: Resultados de masa aérea (fuente propia) ..... 60
Tabla 8: ANOVA - masa aérea (fuente propia) ..... 60
Tabla 9: Resultados de masa radicular (fuente propia) ..... 62
Tabla 10: ANOVA - masa radicular (fuente propia) ..... 62
Tabla 11: Prueba post hoc - masa radicular ..... 64
Tabla 12: Resultados de longitud de raíz (fuente propia) ..... 65
Tabla 13: ANOVA - longitud de raíz (fuente propia) ..... 65
Tabla 14: Prueba post hoc - longitud de raíz (fuente propia) ..... 67
Tabla 15: Resultados de carbono en hojas (fuente propia) ..... 68
Tabla 16: ANOVA - carbono en hojas (fuente propia) ..... 68
Tabla 17: Prueba post hoc - carbono en hojas (fuente propia) ..... 70
Tabla 18: Resultados de carbono en raíz (fuente propia) ..... 72
Tabla 19: ANOVA - carbono en raíz (fuente propia) ..... 72
Tabla 20: Resultados de nitrógeno en suelo (fuente propia) ..... 74
Tabla 21: ANOVA - nitrógeno en suelo (fuente propia) ..... 74
Tabla 22: Resultados de mediciones (fuente propia) ..... 105
Tabla 23: Anexo - resultados en nódulos de raíz (fuente propia) ..... 105
Tabla 24: Anexo - pruebas de normalidad – nódulos en raíz (fuente propia) . 106
Tabla 25: Anexo - prueba de homogeneidad de varianza - nódulos en raíz (fuente propia) ..... 107
Tabla 26: Anexo - ANOVA - nódulos en raíz (fuente propia) ..... 107
Tabla 27: Anexo - prueba post hoc - nódulos en raíz (fuente propia) ..... 109
Tabla 28: Anexo - resultados en masa aérea (fuente propia) ..... 111
Tabla 29: Anexo - prueba de normalidad - masa aérea (fuente propia) ..... 111
Tabla 30: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - masa aérea (fuente propia) ..... 112

Tabla 31: Anexo - ANOVA - masa aérea (fuente propia) ..... 113
Tabla 32: Anexo - resultados en masa radicular (fuente propia) ..... 115
Tabla 33: Anexo - prueba de normalidad - masa radicular (fuente propia)..... 116
Tabla 34: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - masa radicular.. 117
Tabla 35: Anexo - ANOVA - masa radicular (fuente propia)..... 117
Tabla 36: Anexo, prueba post hoc - masa radicular..... 119
Tabla 37: Anexo - resultados en longitud de raíz (fuente propia) ..... 121
Tabla 38: Anexo - prueba de normalidad - longitud de raíz (fuente propia).... 122
Tabla 39: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - longitud de raíz (fuente propia) ..... 123
Tabla 40: Anexo - ANOVA - longitud de raíz (fuente propia)..... 124
Tabla 41: Anexo - prueba post hoc - longitud de raíz (fuente propia)..... 125
Tabla 42: Anexo - resultados en carbono en hojas (fuente propia) ..... 127
Tabla 43: Anexo - prueba de normalidad - carbono en hojas (fuente propia). 128
Tabla 44: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - carbono en hojas (fuente propia) ..... 129
Tabla 45: Anexo - ANOVA - carbono en hojas (fuente propia)..... 130
Tabla 46: Anexo - prueba post hoc - carbono en hojas (fuente propia)..... 131
Tabla 47: Anexo - resultados de carbono total en raíz (fuente propia) ..... 134
Tabla 48: Anexo - prueba de normalidad - carbono en raíz (fuente propia) ... 134
Tabla 49: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - carbono en raíz (fuente propia) ..... 135
Tabla 50: Anexo - ANOVA - carbono en raíz (fuente propia) ..... 136
Tabla 51: Anexo - resultado de nitrógeno en suelo (fuente propia)..... 139
Tabla 52: Anexo - prueba de normalidad - nitrógeno en suelo (fuente propia) 139
Tabla 53: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - (fuente propia).. 140
Tabla 54: Anexo - ANOVA - nitrógeno en suelo (fuente propia)..... 141

**ÍNDICE DE FIGURAS**

PÁG.

Figura 1: Interacción de individuos con su entorno (FAO et al., 1996) ..... 25
Figura 2: Procesos químicos y biológicos de contaminantes (GTIS et al., 2019) ……30
Figura 3: Estructura química de enrofloxacina (Otero et al., 2001) ..... 32
Figura 4: Primera etapa de desarrollo – cotiledón, hoja unifoliada (fuente propia) ……34
Figura 5: Crecimiento competitivo de alfalfa (fuente propia) ..... 34
Figura 6: Formación de hojas trifoliadas (fuente propia) ..... 35
Figura 7: Crecimiento radicular (fuente propia) ..... 35
Figura 8: Simbiosis de rizobio con leguminosa (fuente propia) ..... 37
Figura 9: Formación de nódulo (fuente propia) ..... 38
Figura 10: Sinorhizobium meliloti (fuente: SciMAT 2016) ..... 39
Figura 11: Laboratorio de Ecotoxicología del Centro de Energía Nuclear y Agricultura (CENA) (fuente propia) ..... 41
Figura 12: Flujograma del proyecto ..... 43
Figura 13: Medición de altura de masa aérea de alfalfa (fuente propia) ..... 48
Figura 14: Retiro de muestra de alfalfa de la maceta (fuente propia) ..... 49
Figura 15: Remoción del suelo de la raíz de alfalfa (fuente propia) ..... 49
Figura 16: Pesado de alfalfa (fuente propia) ..... 50
Figura 17: Muestras colocadas en estufa (fuente propia) ..... 52
Figura 18: Tamizado de muestra de alfalfa triturada (fuente propia) ..... 52
Figura 19: Tamizado de muestras de suelo (fuente propia) ..... 54
Figura 20: Comparación de resultados de tratamiento - cantidad de nódulos (fuente propia) ..... 58
Figura 21: Comparación de resultados de tratamiento - masa aérea (fuente propia) ……61
Figura 22: Comparación de resultados de tratamiento - masa radicular (fuente propia) ……63
Figura 23: Comparación de resultados de tratamiento - longitud de raíz (fuente propia) ……66
Figura 24: Comparación de resultados de tratamiento – contenido de carbono en hojas (fuente propia) ..... 69
Figura 25: Comparación de resultados de tratamiento – contenido de carbono en raíz (fuente propia) ..... 73

Figura 26: Comparación de resultados de tratamiento - contenido de nitrógeno en suelo (fuente propia) ..... 75
Figura 27: Alfalfa en crecimiento (fuente propia) ..... 97
Figura 28: Tratamiento – alfalfa (fuente propia) ..... 97
Figura 29: Selección de muestras para análisis (fuente propia) ..... 98
Figura 30: Procedimiento para retirar la muestra de la maseta (fuente propia) 98
Figura 31: Procedimiento para retirar la muestra de la maceta (fuente propia) 99
Figura 32: Procedimiento para limpieza de raíces (fuente propia) ..... 99
Figura 33: Limpieza de raíces - nódulos en raíz (fuente propia) ..... 100
Figura 34: Medición de parte aérea y raíz de alfalfa (fuente propia) ..... 100
Figura 35: Limpieza de raíces para conteo de nódulos (fuente propia) ..... 101
Figura 36: Conteo de nódulos en raíz (fuente propia) ..... 101
Figura 37: Conteo de nódulos (fuente propia) ..... 102
Figura 38: Corte y pesado de tallo y hojas de alfalfa (fuente propia) ..... 102
Figura 39: Control del peso de raíz de alfalfa (fuente propia) ..... 103
Figura 40: Muestras en estufa para evaporar humedad (fuente propia) ..... 103
Figura 41: Cernido de tierra agrícola (fuente propia) ..... 104
Figura 42: Anexo - resultados de cantidad de nódulos en raíz (fuente propia) 108
Figura 43: Anexo - resultados de masa aérea (fuente propia) ..... 114
Figura 44: Anexo - resultados de masa radicular (fuente propia) ..... 118
Figura 45: Anexo - resultados de longitud de raíz (fuente propia) ..... 125
Figura 46: Anexo - resultados de carbono en hojas (fuente propia) ..... 131
Figura 47: Anexo - resultados de carbono en raíz (fuente propia) ..... 137
Figura 48: Anexo - resultados de nitrógeno en suelo (fuente propia) ..... 142

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

PÁG.

Gráfico 1: Cantidad de nódulos (fuente propia)..... 110
Gráfico 2: Masa aérea (fuente propia) ..... 115
Gráfico 3: Masa radicular (fuente propia)..... 120
Gráfico 4: masa aérea – radicular (fuente propia)..... 121
Gráfico 5: longitud de raíz (fuente propia)..... 127
Gráfico 6: Cantidad de carbono en hojas (fuente propia)..... 133
Gráfico 7: Cantidad de carbono de raíz (fuente propia) ..... 138
Gráfico 8: Cantidad de carbono en hojas – raíz (fuente propia)..... 138
Gráfico 9: nitrógeno en suelo (fuente propia)..... 143

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Descripción y formulación del problema

La calidad de vida de las personas va en aumento, a pesar de algunas carencias en determinadas regiones (Boland et al., 2013), este aumento de calidad de vida se refleja en el desarrollo urbano que se ve favorecido por el progreso económico (Zhang et al., 2017), este progreso a su vez, favorece a sectores productivos agrícolas y a la producción de alimentos de origen animal (van Boeckel et al., 2015); por ello es que, aproximadamente el 80 % de los campos de cultivos mundiales se destinan a producir alimento para ganado (FAO et al., 2017). Por otro lado, el uso de antibióticos veterinarios de manera preventiva aumenta, para asegurar la salud en la crianza de ganado (Leavey-Roback et al., 2016), ya que estos medicamentos ayudan a tratar y prevenir padecimientos en animales de granja (OMS et al., 2017).

Es por ello que, los antibióticos de amplio espectro como enrofloxacina (ENR), son usados para combatir enfermedades producidas por bacterias (Attili et al., 2016); el uso preventivo, provoca que el tiempo en que se suministran al ganado sea irregular, impidiendo que se puedan asimilar por el organismo del animal (Tasho et al., 2016), esto provocaría que la parte que no sea asimilada, se acumule en el organismo y se deseche a través de las excretas que a su vez, son utilizados para producir abono natural (Jechalke et al., 2014), estos medicamentos se convertirían en residuos, llegando al suelo con sus funciones bactericidas activas (Carvalho et al., 2016), pudiendo afectar a las comunidades de bacterias en el ambiente (Jechalke et al., 2014), ya que la presencia y persistencia de los residuos de antibióticos en suelo (Koba et al., 2017) influiría en las funciones de las bacterias como la fijación de nutrientes en plantas y en funciones de descomposición de materia orgánica (Duchene et al., 2017), afectando a microorganismos que tienen relación simbiótica con

plantas leguminosas como la alfalfa (*Medicago sativa*) y la bacteria *Rhizobium sp* que ayuda a fijar nitrógeno atmosférico a dicha planta (Ju et al., 2019).

Los residuos de antibióticos llegan al suelo a través del estiércol y los biosólidos, considerados como fuentes de almacenamiento de estos residuos (Shan et al., 2018), debido a que el sistema digestivo de los animales de granja, presenta una débil asimilación de antibióticos, por lo que las excretas como la orina y heces son contaminadas (Sarmah et al., 2006); las excretas al ser usadas para la producción de abono, pueden extender la presencia de los residuos de antibióticos por tres (03) meses aproximadamente (Albero et al., 2018), ya que, estudios previos con enrofloxacina, demostraron que presenta una lenta degradación en suelo (Buta et al., 2021), esto pudiera deberse a que, al estar presente en el estiércol y posteriormente en el abono natural, estaría protegido de agentes externos que pudieran degradar los residuos de antibióticos (W. Kong et al., 2012), indicando que es posible que el uso continuo de fertilizantes naturales producidos con estiércol, sean el medio de ingreso para que estos residuos lleguen al suelo agrícola en cantidades a considerar (Sun et al., 2017).

Una fuente importante de residuos de antibióticos son las excretas de ganado (Zhou et al., 2020), por ello, los efectos de estos residuos favorecen a la aparición de genes de resistencia, que pueden traer riesgos ecológicos (Gao et al., 2019), ya que las bacterias afectadas pueden transferir sus genes a bacterias patógenas volviéndolas resistentes (Harms et al., 2016), estas nuevas bacterias pueden desplazar a los microorganismos benéficos que a su vez son afectadas por los residuos de antibióticos (Schierstaedt et al., 2020), debido al efecto bacteriostasis que poseen los antibióticos (Liu et al., 2020); la enrofloxacina actúa frente al ADN girasa inhibiéndola (Papich et al., 2021), esto puede afectar a la captación de nutrientes que realizan los microorganismos para las plantas, lo que disminuiría la

producción vegetativa (Lu et al., 2017); es por ello que, en el presente estudio se evaluó el efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de nódulos producidos en raíz, producción de biomasa en gramos, cantidad de carbono orgánico en gramos por kilogramos (g $Kg^{-1}$) de alfalfa (*Medicago sativa*) y nitrógeno contenido en suelo medido en gramos por kilogramos de suelo (g $Kg^{-1}$).

## 1.2. Formulación del problema

### 1.2.1. Problema general

¿Cuál será el efecto del residuo de enrofloxacina en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*) y en el contenido de nitrógeno en suelo?

### 1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál será el efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de nódulos producidos en raíz de alfalfa?
- ¿Cuál será el efecto del residuo de enrofloxacina en la producción de biomasa fresca aérea y radicular de alfalfa?
- ¿Cuál será el efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de carbono total en hojas y raíz de alfalfa?
- ¿Cuál será el efecto del residuo de enrofloxacina en el nitrógeno total acumulado en suelo?

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del residuo de enrofloxacina en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*) y en el contenido de nitrógeno en suelo.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de nódulos producidos en raíz de alfalfa.
- Evaluar el efecto del residuo de enrofloxacina en la producción de biomasa fresca aérea y radicular de alfalfa.
- Evaluar el efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de carbono total en hojas y raíz de alfalfa.
- Evaluar el efecto del residuo de enrofloxacina en el nitrógeno acumulado en suelo.

## 1.4. Justificación e importancia

El departamento de Moquegua cuenta con un campo vasto para las actividades agropecuarias, las que favorece a su economía con los productos que obtienen; según el Anuario Estadísticos de Producción Ganadera y Avícola 2020, la población de ganado registrado es de 23 687 unidades para ganado vacuno, 8 289 unidades para ganado caprino, 47 899 unidades para ganado ovino y 13 102 unidades para ganado porcino (Aiassa et al., 2020), ésta producción requiere de recursos para la alimentación de dichos animales, siendo la alfalfa uno de ellos y que según el Boletín Estadístico “EL Agro en Cifras” del 2020 se produjo 756 055 toneladas de alfalfa (MAGA et al., 2020), a esto se le suma el uso de medicamentos suministrados al ganado para prevenir enfermedades como lo señala el formato farmacéutico de especificaciones técnicas para la adquisición de productos farmacéuticos de uso veterinario y que si bien, no se cuenta con un registro de la frecuencia del uso de medicamentos veterinarios para ganado, si se cuenta con un consolidado de medicamentos veterinarios que están disponibles y dispuestos por SENASA (Memor, 2012), registrados como productos de uso veterinario y alimentos para animales; estos se convertirán en residuos que

posteriormente serán eliminados a través de la orina y las heces siendo empleados como abono para suelo como también para cultivo, estos residuos podrían estar afectando a los microorganismos benéficos que guardan una relación simbiótica con las plantas leguminosas como es el caso de la alfalfa (*M. sativa*) y el microorganismo *Rhizobium sp*. En vista de que los estudios realizados respecto a estos temas no son bastos para determinar una conclusión concreta, se busca evaluar el efecto del residuo de enrofloxacina en el cultivo de alfalfa y en el contenido de nitrógeno en el suelo, a fin de proporcionar datos de los posibles efectos de este contaminante emergente.

## 1.5. Hipótesis

### 1.5.1. Hipótesis general

El residuo de enrofloxacina afecta de modo negativo al cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*) y a la cantidad de nitrógeno en suelo.

### 1.5.2. Hipótesis específicas

- El residuo de enrofloxacina afecta de modo negativo a la producción de nódulos en la raíz de alfalfa.
- El residuo de enrofloxacina afecta de modo negativo a la producción de biomasa fresca aérea y radicular de alfalfa.
- El residuo de enrofloxacina disminuye el carbono total en hojas y raíz.
- El residuo de enrofloxacina disminuye el nitrógeno contenido en suelo.

# II. MARCO TEÓRICO

## 2.1. Antecedentes

Efectos ecológicos de los antibióticos en el ecosistema natural (Grenni et al., 2018), llegó a la siguiente conclusión:

- Existe preocupación con relación a la presencia de contaminantes antibióticos, en el impacto de la comunidad microbiana y sus funciones ecológicas, dichos contaminantes pueden afectar directamente a través del efecto bactericida, o indirectamente generando variabilidad genética. Esto ha generado que se realicen programas nacionales para reducir la cantidad de contaminantes antibióticos en el ambiente; y a pesar de que se ha registrado una reducción en la propagación de la resistencia a los antibióticos, se cree que es poco probable que se restablezca el número en la población microbiana, ya que, por la composición de estos, podrían llegar a ser sensibles frente a los contaminantes antibióticos, esto afectaría directamente a los procesos de los ecosistemas.

Destino y efectos de los antibióticos veterinarios en el suelo (Jechalke et al., 2014), llegó a la siguiente conclusión:

- Aún no se tiene una clara comprensión sobre los efectos de los antibióticos suministrados al ganado que se encuentran en las heces y orina que posteriormente serán usados como abono natural para cultivos, estos antibióticos pueden ser usados por bacterias y alterar su estructura y funciones a corto y largo plazo, dependiendo de la concentración que en muchos casos es suficiente como para generar alteraciones. Pero se sabe poco sobre la relación dosis-respuesta; por lo que, se debe realizar un estudio más sofisticado del destino y efectos de diferentes clases de antibióticos, ya que esto puede influir en el microbioma humano, desencadenando un aumento en la amenaza de patógenos humanos multirresistentes.

La enrofloxacina en concentraciones relevantes para el medio ambiente aumenta la absorción y la toxicidad de cadmio en la lombriz *Eisenia fétida* en suelos de granjas (Y. Li et al., 2016), llegó a la siguiente conclusión:

- Se analizaron la presencia de enrofloxacina y cadmio en cantidades relevantes para los suelos agrícolas en los procesos metabólicos de lombrices de tierra, cuyas características es la captación de cadmio en el suelo, esta captación se vio intensificada por la presencia del fármaco enrofloxacina dando lugar a efectos negativos impidiendo el desarrollo de los procesos metabólicos de dicho organismo y trayendo como consecuencia la disminución de la calidad del suelo agrícola producida por la ausencia de la aireación que realizan las lombrices de tierra, disminución de la permeabilidad del agua y la reproducción microbiana. Estos resultados dejan como evidencia que el efecto tóxico del cadmio contenido en agroquímicos se ve intensificado por la presencia de enrofloxacina que se usa como medicamento para animales de granja, por ello, se busca con este estudio que se dé importancia a evaluar los efectos y las consecuencias que traen las combinaciones de compuestos presentes en el ambiente producido de manera natural o antropogénica.

Eliminación asistida por baterias de fluoroquinolonas de rizosfera de trigo en un suelo agrícola (Riaz et al., 2019), llegó a la siguiente conclusión:

- La ecología del suelo se ve amenazada por el consumo continuo de fluoroquinolonas ya que, debido a los residuos que se generan, pueden estar afectando a la población microbiana del suelo que tienen un papel asociativo con la vegetación, por tal razón se examinó la biodegradación de ciprofloxacino, enrofloxacina y levofloxacina presente en suelo a escala de invernadero, con la ayuda combinada de microorganismos y planta de trigo. Se registró que por separado las bacterias y el trigo, no

tienen la misma eficacia en degradar los antibióticos mencionados, además que el trigo mejora la biodisponibilidad de estos compuestos en el suelo, sin embargo, en cooperación las bacterias (género: *Ensifer*, *Escherichia*) resistentes a los antibióticos y la planta de trigo, se logró registrar una disminución en la concentración de estos fármacos, por lo que no se descarta que la degradación asistida bacteriana sea una técnica rentable y ambientalmente amigable para la eliminación de contaminantes emergentes.

Destino de los antibióticos en el suelo y su absorción por los cultivos comestibles (Pan et al., 2017), llegó a la siguiente conclusión:

- Actualmente existe diferencias sobre el destino, propiedades de transporte, fitotoxicidad en las plantas y riesgos medioambientales de los antibióticos, por ello, el conocimiento de estos, ayudará a dar una evaluación de riesgos ecológicos, ya que la información sobre efectos ecotoxicológicos por la adición de aguas residuales son poco conocidos dando resultados no tan precisos, por tal motivo se debe realizar estudios para comprender su fitotoxicidad, translocación, de los antibióticos en las plantas y datos de campo sobre la concentración de estos, esto ayudará a entender si las aguas residuales contaminados con antibióticos, sirven como un conducto principal para la contaminación.

La tetraciclina y la sulfametazina alteran los procesos de reducción disimilatoria de los nitratos y aumentan la liberación de $N_2O$ (Shan et al., 2018), llegó a la siguiente conclusión:

- Los análisis en los biosólidos y estiércol liberado al ambiente, contiene grandes cantidades de antibióticos que persisten en el suelo, los resultados arrojaron que, en concentraciones considerables para el ambiente, puede reducir los procesos de reducción de nitratos en los suelos de arrozales. Estos resultados

arrojaron respuestas de las transformaciones de nitrógeno expuesto a los contaminantes de antibióticos, este efecto estaría contribuyendo a la liberación de óxido nitroso a la atmósfera, por lo que se debe evaluar los riesgos ambientales frente a los antibióticos.

Variaciones de la comunidad bacteriana en suelos de arrozales inducidas por la aplicación de antibióticos veterinarios en sistemas planta-suelo (Uddin et al., 2019), llegó a la siguiente conclusión:

- Luego de examinar cuatro suelos de cultivo de arrozales con diferentes propiedades fisiológicas y diversidad microbiana, se detectó cambios significativos frente a la presencia de antibióticos, la diversidad microbiana disminuyó considerablemente, pero la cantidad de determinadas bacterias se mantuvo con una concentración de 200 µg $kg^{-1}$ de antibióticos en suelo, siendo las actinobacterias y firmicutes los que disminuyeron, mientras que los bacteroidetes y acidobacterias aumentaron en presencia de antibióticos.

Impacto de la co-inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y rizobios en las respuestas bioquímicas del sistema alfalfa-suelo en suelos contaminados con cobre (Ju et al., 2019), llegó a la siguiente conclusión:

- Los estudios ejecutados con la co-inoculación de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, siglas en inglés): *Rhizobium*, *S. meliloti* y *P. mucilaginosus*, arrojaron que la biomasa vegetal fue mayor que con las muestras no inoculadas ayudando además a que los niveles de N, P y K en las raíces fueran favorables en las plantas. A su vez, estas bacterias ayudaron a que la alfalfa (*Medicago sativa*) pudiera soportar las concentraciones de cobre que fueron inducidos en el experimento como también a la diversidad microbiana del suelo, ayudando así a la fertilidad del suelo con presencia de cobre,

generando un impacto potencial en el tratamiento de suelos contaminados con metales aumentando el potencial de absorción de la alfalfa.

## 2.2. Bases teóricas sobre el tema de investigación

- **Ambiente o medio ambiente:** se denomina al conjunto de factores o elementos físicos, químicos, biológicos y sociales, que rodean y con los que interactúan los seres vivos, como los elementos abióticos que a su vez están sujetos a diferentes influencias como a acontecimientos; plantas y animales dependen de componentes que caracterizan al medio donde crecen para poder desarrollarse y reproducirse; por lo que, la escases de algún recurso llevaría a la adaptación paulatina de algún organismo para poder superar esas limitaciones y generar tolerancias frente al nuevo panorama en el que se desarrollará, esto indica que el medio ambiente posee factores decisivos como el clima o la geografía, para permitir la adaptación de los organismos a un nuevo entorno sea en el aspecto natural o social (FAO et al., 1996).

Existen interacción importantes entre seres vivos donde se benefician mutuamente, a esto se le conoce como factores bióticos que incluyen animales, plantas y microorganismos, cada parte cumple una función que beneficia a otra desde los microorganismos que enriquecen el suelo para que las plantas puedan desarrollarse, hasta los frutos que generan estas plantas para brindar alimentos a animales que a su vez, servirán de sustento para animales depredadores y finalmente sus residuos servirán para el desarrollo de microorganismos, que ayudarán a enriquecer el suelo por medio de la descomposición que dará nutrientes para el posterior desarrollo de más plantas, formando parte de una cadena alimenticia equilibrada (FAO et al., 1996).

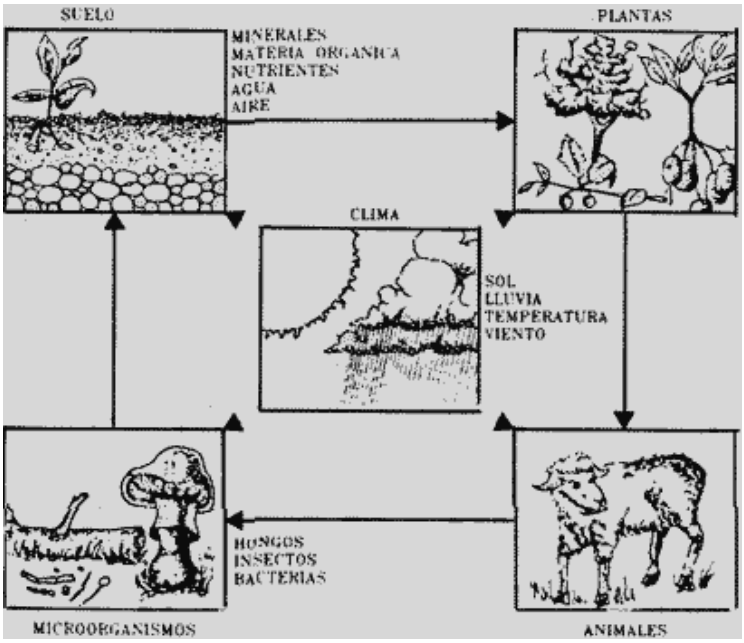



*Figura 1: Interacción de individuos con su entorno* (FAO et al., 1996)

- **Antibióticos:** es una sustancia química que se obtiene de un ser vivo por el proceso de síntesis, en otras palabras, son medicamentos que combaten enfermedades, atacando sus procesos al destruir la estructura de la bacteria o inhibiendo la capacidad de reproducirse o dividirse; estos fármacos son frecuentemente prescritos; por lo que, su tratamiento es eficaz contra dolencias tanto en personas como en animales, esto conlleva a que se aconseje y se tenga un control sobre las dosis y la frecuencia con que se suministran ya que se debe considerar factores como la localización infectada, características del paciente y el tipo de microorganismo causante de la infección (Tazi et al., 2007); debido a las consecuencias negativas que pueda traer el consumo excesivo de estos medicamentos, se aconseja su uso moderado ya que no son completamente asimilados y posteriormente expulsados llegando al ambiente pudiendo traer consecuencias negativas para este medio y para la salud humana (Pascual Anderson et al., 2014).

- **Bacteria:** es un organismo microscópico unicelulares, que puede reproducirse copiando sus cromosomas y formando dos

copias idénticas, siendo las formas de vida más antiguas y por ende estos son indispensables para la vida en el planeta, llegando a vivir en distintos medios y ambientes; incluso dentro de otros organismos formando una relación de simbiosis en algunos casos, ya que muchos ayudan a la captación de nutrientes del ambiente para poder reducirlos y ser más accesibles para otros organismos como plantas (García et al., 2011).

A pesar de que no todas las bacterias pueden llegar a ser dañinas, de ser el caso lo provocan liberando toxinas que causan enfermedades en los huéspedes, desencadenando en respuestas inmunes por parte del sistema inmunológico del huésped afectado ya que estas bacterias invaden los tejidos y células, pueden generar inflamaciones que pueden afectar al sistema nervioso, sistema digestivo, entre otros. Los estudios a través de los años ayudaron a determinar que algunos tienen mayor virulencia que otros provocando problemas más graves, pero proporcionando información para poder entender el desarrollo y el comportamiento de estos agentes, además de poder evaluar la evolución que poseen los huéspedes frente a estos microorganismos (García et al., 2011).

- **Bacterias gram negativa:** se denomina a aquellas que poseen tinción gram, quiere decir que con la aplicación de unos reactivos se podrá distinguir un color rosado y vienen siendo bacterias dañinas y resistentes a antibióticos debido a los mecanismos usados por estas bacterias que están en constante progreso, muchos de estos mecanismos se ven favorecidas por la protección que presentan al estar envueltas en capsulas que las aíslan y las protegen de agentes dañinos para su sistema, esta protección se potencia por una membrana externa que poseen, siendo esta la protección que necesitan contra los antibióticos y volviéndolos resistentes, a su vez, que el deterioro de esta membrana libera sustancias tóxicas que contribuyen a agravar más los síntomas de alguna infección.

Pueden presentar resistencia a los antibióticos debido a diversos factores, el traspaso de genes resistentes a sus futuras generaciones siendo un factor natural que poseen los organismos para poder adaptarse al entorno en el que viven para asegurar la prosperidad de la especie, también pueda deberse a la mutación que se pueda generar en cuanto a sus genes. Lamentablemente estas bacterias traen consecuencias negativas para los huéspedes como infecciones por *Campylobacte*r, cólera, entre otras; pueden ser transportados por animales domésticos siendo un peligro ya que fácilmente pueden transmitirse a otros huéspedes. También poseen algunas funciones necesarias para el ambiente como el de fijar nutrientes para plantas, formando un laso que contribuye al ambiente.

- **Bacterias gram positivas:** se denomina a aquellas que poseen tinción gram, que con ayuda de reactivos se teñirán de color azul, generalmente se asocian a la piel y a las mucosas; por lo que, son resultado de presencia de individuos con estas características, esto no descarta que estos individuos no sean susceptibles a enfermedades que puedan causar este tipo de bacterias ya que, pueden generar problemas en tractos respiratorios desencadenando faringitis y bronquitis. Sin embargo, estas son susceptibles a medicamentos como la penicilina ya que la pared celular que la rodea no es tan completa como las bacterias gram negativa.

Estas bacterias causan infecciones como carbunco, difteria, infecciones por enterococos, infecciones neumocócicas, entre otros; muchos llegan a ser tratados con medicamentos para contrarrestar sus infecciones, sin embargo, el seguido uso de antibióticos está volviéndolos resistentes a medicamentos, como las bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM), siendo este medicamento un tipo de penicilina, estas bacterias suelen estar relacionadas con infecciones que son contraídas en muchos centros de salud. Si bien su predominancia

en el ambiente es menor que las bacterias gran negativas, su importancia en la evolución de su resistencia es de igual relevancia ya que al reproducirse generan genes de resistencia que se ve potenciada con la presencia de residuos de antibióticos en el ambiente.

- **Biotransformación:** es el proceso por el cual una sustancia se convierte en otro producto químico gracias a una reacción en el organismo, este proceso es fundamental para poder aprovechar los nutrientes absorbidos y medicamentos donde un metabolito posee el efecto terapéutico. Existen organismos que están expuestos a sustancias químicas en el ambiente que son absorbidas por su sistema acumulándose, en respuesta, este organismo genera reacciones metabólicas modificando la estructura de la sustancia acumulada.

En el ambiente existen sustancias que sirven de alimento para otros organismos; sin embargo, estos están en un estado que fácilmente no puede ser absorbido o aprovechado, por lo que intervienen microorganismos para poder modificar estas sustancias y ser aprovechadas, esta biotransformación modifica la composición de elementos como los metales que están presentes en el ambiente (Soto et al., 2010).

La capacidad de biotransformación de los organismos es diferente y está relacionada con el grado de exposición que se tenga con algún elemento presente en el ambiente, tomando material para poder transformarla en compuestos accesibles, como la transformación de glucosa en ácido láctico, o procesos como fermentación donde intervienen microorganismos degradando materia orgánica para aprovechar los nutrientes como el nitrógeno y carbono necesario para el desarrollo de las plantas y enriqueciendo al suelo.

- **Concentración química:** se denomina a la relación de una sustancia diluida en una proporción o cantidad de otra sustancia; por lo que, el soluto que viene a ser la sustancia que está diluida en un solvente y que son medibles por unidades físicas y unidades químicas, siendo las físicas las que definen a la sustancia en masa, volumen o partes, y la química la define como la concentración de la solución por moles químicos que presenta.

Existen sustancias químicas en el ambiente, ya sea en el aire, agua o suelo, sea de forma natural o por acción humana; esto trae un impacto dependiendo a la cantidad de sustancia que se encuentre o que se libere, estas concentraciones muchas veces no pueden presentar impactos inmediatos o efectos negativos a simple vista, pero con el tiempo llegan a ser un problema por la aparición de más concentraciones de estas sustancias, ya que, al no ser visibles pueden llegar a entrar a la cadena alimenticia a causa de algunos organismos que puedan absorberlos (Environmental et al., 2009).

Existen concentraciones en el ambiente, como por ejemplo en el aire que, tomando al nitrógeno, este tiene una concentración aproximada del 78 % en el planeta, esta concentración se puede desplazar al suelo donde microorganismos aprovechan para poder realizar procesos de transformaciones y brindar beneficios al ambiente con nutrientes.

- **Contaminación:** es una alteración negativa en el ambiente, relacionado a la introducción de agentes nocivos, que pueden ser químicos, físicos o biológicos, estos provocan deterioro en la calidad de vida de los seres vivos debido a las concentraciones de elementos nocivos que pueden tener origen natural u origen humano. La cantidad de contaminantes y la diversidad que estos poseen, se debe al desarrollo tanto industrial como agroquímico, cuyos residuos al entrar en contacto con la actividad biológica del ambiente sufren transformaciones en sustancias difíciles de identificar además de ser costosas para su análisis.

Siendo un tema de alarma, esto se identifica como una amenaza para las funciones del suelo, la presencia de contaminantes interviene en los procesos como los ciclos de nutrientes o interviniendo en la acidificación del suelo. Existen fuentes agrícolas y ganaderas que acrecientan este problema con el uso de agroquímicos o medicamentos en exceso; el compostaje con los residuos de animales es una fuente importante de nutrientes para el suelo, además de que contribuye a la economía circular reduciendo impactos ambientales y mejorando la cantidad de nutriente como el nitrógeno en el suelo, sin embargo, investigaciones científicas están evidenciando el aumento de posibles focos de infección y residuos de antibióticos veterinarios presentes en las excretas del ganado, esto trae como consecuencia la proliferación y desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos, la contaminación por estos residuos es silenciosa pero amenaza con traer repercusiones futuras (GTIS et al., 2019).

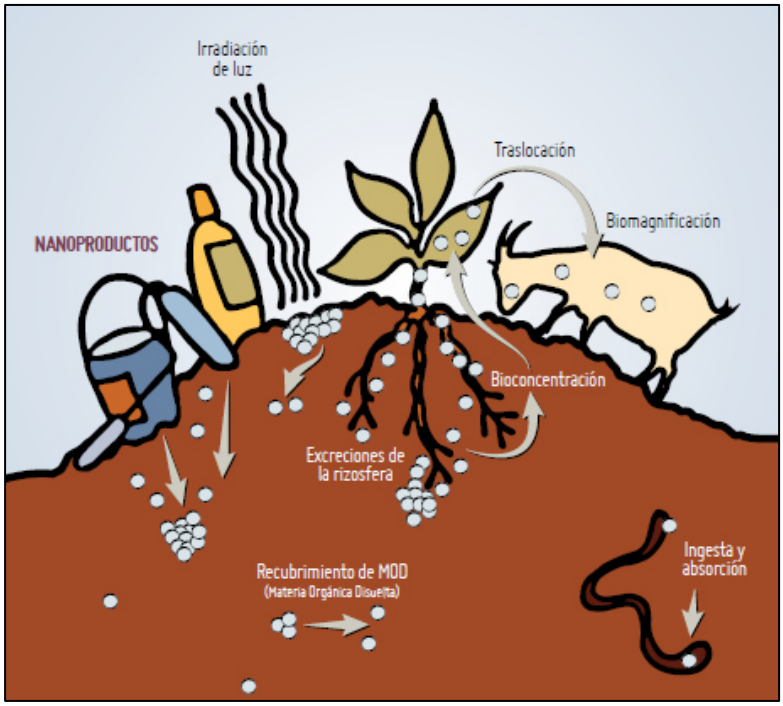



*Figura 2: Procesos químicos y biológicos de contaminantes* (GTIS et al., 2019)

- **Ecosistema del suelo:** es un complejo sistema de animales, vegetales y microorganismos denominados comunidades, que

interactúan con su ambiente, aquí se presenta una diversidad biológica como pequeños organismos vegetales y animales que cumplen funciones determinadas con los sistemas biológicos, atmosféricos e hídricos, ayudando al ciclo de los nutrientes, regulando la cantidad de materia orgánica a través de la descomposición, como también a la captación de carbono y nitrógeno en estado gaseoso en el aire, esto ayuda a la eficiencia en la absorción de nutrientes para la vegetación mediante las relaciones mutuas benéficas, siendo fundamentales para el funcionamiento del ecosistema.

Aquí, diversos organismos prestan servicios ambientales, contribuyendo directa o indirectamente a la producción agrícola, pudiendo sustituir a algunos insumos agrícolas que llegan a ser nocivos para el suelo y para la vida que alberga, esto afectaría a la calidad y a la salud de los suelos ya que la permanencia de estos productos provocaría un desequilibrio que este medio acondiciona para asegurar la producción sostenible agrícola y la calidad medioambiental (Montanarella et al., 2016).

- **Enrofloxacina:** es un antibiótico cuya fórmula molecular es C19H22FN3O3, con nombre IUPAC ácido 1-ciclopropil-7-(4-etilpiperazin-1-il)-6-fluoro-4-oxoquinolina-3-carboxílico; usado en el campo de la veterinaria, gracias a su potente acción bactericida, se lo utiliza para el tratamiento y control de varias enfermedades como las respiratorias, digestivas, cutáneas; usado en ganado bovino, porcino, caprino, como también en animales domésticos como perros, gatos.

Este medicamento forma parte de un grupo de medicamentos denominados fluoroquinolonas, su acción se basa en la inhibición de la ADN-girasa que viene a ser una enzima que poseen las bacterias, necesaria para los procesos biológicos que comprometen la transcripción, recombinación, replicación y reparación de sí mismo, esto demuestra el poder bactericida que

posee este fármaco. Siendo eficaz contra bacterias gram negativas, existen condiciones en donde su efectividad disminuye como las de medios ácidos que es contrario a bacterias gram positivas con quienes su eficacia es la misma en medios ácidos; en general, la enrofloxacina es eficaz al actuar contra bacterias gram negativas y gram positivas inhibiendo su crecimiento poblacional, alterando su estructura y llegando a disminuir los mecanismos de resistencia bacteriana.

Debido a su amplio campo de tratamiento, lo convierte en un medicamento primordial para combatir enfermedades infecciosas para animales, sin embargo, existe evidencia que indica que el uso excesivo da paso a la aparición de genes de resistencia bacteriana debido a que llegan al ambiente por medio de las excretas provocando una mutación de los cromosomas de las bacterias en el ambiente (Otero et al., 2001).

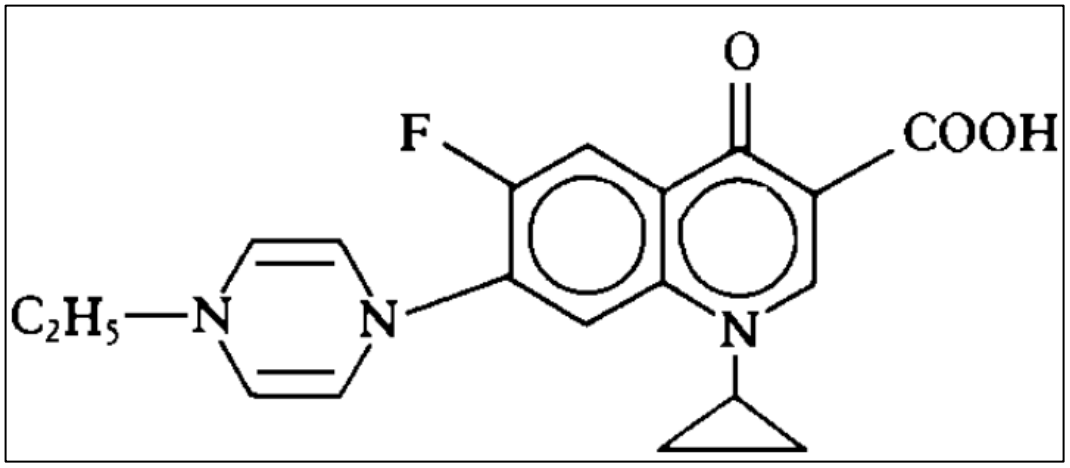



*Figura 3: Estructura química de enrofloxacina* (Otero et al., 2001)

- **Planta de alfalfa:** es una especie forrajea, en su proceso de crecimiento se fija al suelo quedando inmóvil y de donde obtiene sus nutrientes, muchos de ellos proporcionados con ayuda de microorganismos benéficos. La alfalfa pertenece a la familia de las plantas leguminosas, posee tallo delgado, pero con la suficiente fuerza para poder soportar el peso de las hojas que son unifoliadas

y trifoliadas, donde su flor se caracteriza por ser parte de la subfamilia Papilonoidea de color azul con tonalidades purpura.

La semilla de alfalfa posee formas que se asemejan a un riñón con tonalidades amarillas que en maduración llegan a medir de 1 a 2 mm de longitud con 1 a 2 mm de ancho por 1 mm de espesor; en el proceso de siembra, se forma el funículo que mantiene unida a la semilla con el fruto, posee un protector externo que sirve para cubrir al embrión que dará origen a la plántula donde se pueden observar radícula, hipocótilo, la plúmula y los cotiledones.

La germinación de la planta de alfalfa comienza cuando la semilla tiene contacto con el suelo al que se le suministrará agua para que ocurra la transformación para desarrollar la raíz, los cotiledones se van asomando por la superficie del suelo con ayuda de las reservas que posee la semilla, esto es apoyado con la humedad que presenta el suelo, cabe destacar que se debe tener cuidado con la aireación que requiere ya que, esto es necesario para el desarrollo de la plántula. Este desarrollo genera un sistema radicular robusto y profundo para cumplir la labor de absorción de agua. El tallo primario tiene forma cuadrada presentando estomas, en la parte herbácea presenta nudos que dan paso al crecimiento de hojas, la cantidad de tallos dependerá del vigor que posea la planta, seguidamente da paso a la formación de la corona que es una estructura que almacena sustancias de reserva para formar nuevos rebrotes de la planta; la hoja por su parte presenta una primera aparición unifoliada, las segundas son pinnaticompuestas que se originan en el ápice del tallo, posteriormente estas hojas también se originaran en las yemas laterales que están en los nudos de los tallos.



*Figura 4: Primera etapa de desarrollo – cotiledón, hoja unifoliada (fuente propia)*



*Figura 5: Crecimiento competitivo de alfalfa (fuente propia)*



*Figura 6: Formación de hojas trifoliadas (fuente propia)*



*Figura 7: Crecimiento radicular (fuente propia)*

- ***Rhizobium sp:*** es un género de microorganismo que pertenece al grupo de bacterias rizobios, que se caracterizan por tener capacidades asociativas de simbiosis con plantas leguminosas y por ser móviles ya que se ven atraídas por las raíces de dicha

planta, esto conlleva a la asociación simbiótica que genera unas terminaciones u órganos denominadas nódulos que se desarrollaran en las raíces, siendo estas las encargadas de fijar el nitrógeno ya mencionado.

El *Rhizobium sp* tiene la capacidad de asociarse con aproximadamente 110 géneros de plantas leguminosas, estos por separado no podrían fijar nitrógeno sin la cooperación mutua y para que esta fijación se dé luego de haberse asociado, el microorganismo necesita de oxígeno para poder hacer la fijación; existe la enzima denominada nitrogenasa que es la encargada de activar el proceso de fijación, esta enzima es frenada por el oxígeno que necesita la bacteria, por lo que entra la acción asociativa que poseen la planta leguminosa con este microorganismo ya que gracias a la proteína leghemoglobina regula la concentración de oxígeno en el interior del nódulo y de tal forma, poder comenzar la acción de fijación por lo que el microorganismo pasa al citoplasma de la célula radical donde se ve rodeado por su propia membrana formando lo que se denomina como simbiomasa que tendrá como función fijar el nitrógeno atmosférico (García et al., 2011).

- **Simbiosis rizobio y leguminosa:** la simbiosis es una interacción o asociación entre especies, mayormente entre microorganismos y seres vivos como animales, vegetales y humanos, esta relación tiene la finalidad de generar beneficios mutuos para el desarrollo de la vida. Los rizobios son microorganismos que habitan en el suelo caracterizados por tener la capacidad de asociarse con otro organismo, su clasificación se basa en 14 géneros, que va cambiando conforme las investigaciones avanzan, incluyendo el *Sinorhizobium* del cual se desprende la cepa *Sinorhizobium meliloti* emparejada con la planta de la alfalfa; las plantas que poseen la capacidad de establecer relaciones simbióticas con estas bacterias son las denominadas

*Leguminosae* perteneciendo a la familia de plantas que poseen flor.

La asociación se genera gracias a un proceso entre la bacteria y la planta que genera un órgano denominado nódulo que es el encargado de la fijación de nitrógeno atmosférico, esta interacción representa cambios en la morfología y fisiología del rizobio y la planta leguminosa que a su vez son influenciados por el ambiente en el que se encuentren; las plantas segregan una sustancia orgánica a través de sus raíces volviendo su entorno en un ambiente rico en nutrientes formando así, un ambiente favorable para el desarrollo de la fauna microbiota por lo que dependiendo de la sustancia que segreguen las plantas, se podrá regular la cantidad de microorganismos presentes en el suelo generando así un nicho favorable para el desarrollo de ciertas bacterias ya que los rizobios al ser organismos de vida libre, deben incorporar nutrientes en su sistema por lo que responderán a ambientes que presenten condiciones necesarias para su desarrollo, demostrando alguna adaptabilidad ya que se le suma su capacidad para generan asociaciones simbióticas con plantas leguminosas (García et al., 2011).



*Figura 8: Simbiosis de rizobio con leguminosa (fuente propia)*



*Figura 9: Formación de nódulo (fuente propia)*

- ***Sinorhizobium meliloti (S. meliloti)*:** (antes *Rhizobium meliloti*) se le denomina a una cepa del género *Sinorhizobium*, es una bacteria gran negativa asociada y utilizada para mejorar el crecimiento de alfalfa (*M. sativa*) ya que, gracias a los bacteroides contenidos en los nódulos de la raíz de la planta es que se fija el nitrógeno atmosférico; cada célula posee flagelos perítricos que están en agua cuando la densidad celular es baja (Aizawa et al., 2014).

La inoculación de este microorganismo a la planta de la alfalfa ayuda al aprovechamiento de nutrientes como el nitrógeno, reduciéndolo para que pueda ser captado por las raíces de esta planta, además es usado para evaluar las respuestas bioquímicas del suelo con presencia de metales pesados que puedan entrar en contacto con cultivos, reduciendo el daño de estos contaminantes como también reduciendo la acumulación, favoreciendo a la biomasa de la alfalfa como a la biomasa microbiana del suelo aumentando así la fertilidad de este medio. Este microorganismo genera la formación de nódulos en la planta para poder ayudarla a protegerse de microorganismos patógenos que pudieran estar presentes (Ju et al., 2019), sin embargo, se ven afectados por contaminantes que atacan directamente bacterias, reduciendo su número como también la fertilidad que estos ofrecen.

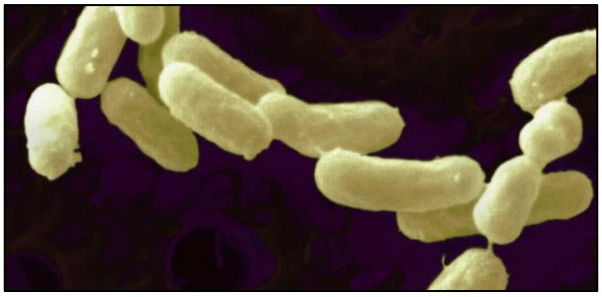


*Figura 10: Sinorhizobium meliloti (fuente: SciMAT 2016)*

# III. METODOLOGÍA

## 3.1. Tipo y nivel de investigación

### 3.1.1. Tipo de investigación

El presente estudio se enmarca dentro de la investigación básica, así mismo se encuentra dentro de la siguiente clasificación

**a) Según la extensión del estudio es:**

Experimental, se manipularán variables y se tendrá un control.

**b) Según el nivel de medición:**

Cuantitativa ya que, se busca determinar las variaciones de nutrientes en planta y suelo, como también la biomasa en planta.

### 3.1.2. Nivel de investigación

Considerando el grado de profundidad con la que se abordó el presente estudio y según el alcance de los objetivos, el nivel de investigación es experimental.

*Tabla 1: Representación de variables*

| Objetivos específicos | Variables | Unidad | Indicadores |
|---|---|---|---|
| Evaluar el efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de nódulos producidos en raíz de alfalfa. | Nódulos en raíces | Unidad | Número de nódulos |
| Evaluar el efecto del residuo de enrofloxacina en la producción de biomasa fresca aérea y radicular de alfalfa. | Biomasa aérea y radicular | gr | Gramos de la biomasa. |
| Evaluar el efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de carbono total en hojas y raíz de alfalfa. | Concentración de carbono en hojas y raíz | g $kg^{-1}$ | Cantidad de carbono. |
| Evaluar el efecto del residuo de enrofloxacina en el nitrógeno acumulado en suelo. | Concentración de Nitrógeno | g $kg^{-1}$ | Cantidad de nitrógeno. |

### 3.2. Ámbito temporal y espacial

El estudio se realizó en el Laboratorio de Ecotoxicología del Centro de Energía Nuclear y Agricultura (CENA).

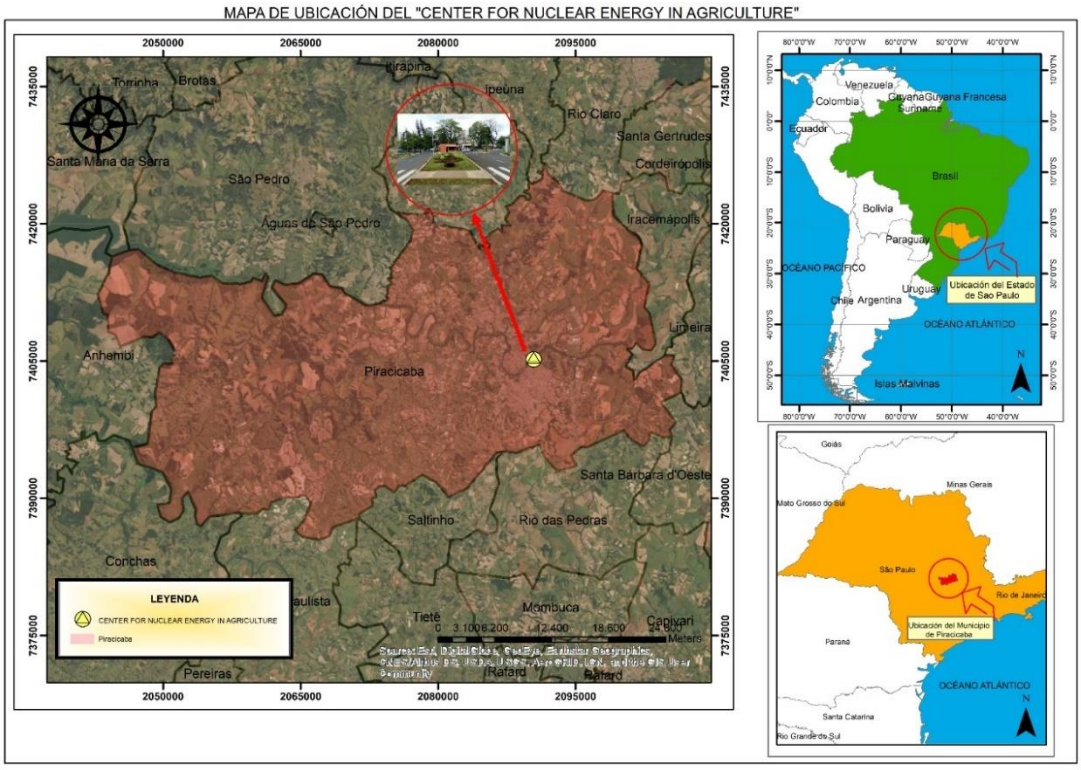



*Figura 11: Laboratorio de Ecotoxicología del Centro de Energía Nuclear y Agricultura (CENA) (fuente propia)*

## 3.3. Población y muestra

Tanto la población como la muestra fueron 12 objetos de estudio (macetas) y cada uno contó con 10 semillas de alfalfa previamente inoculadas con *Rhizobium sp* (Ju et al., 2019).

## 3.4. Instrumentos

### 3.4.1. Insumos

- Semillas de alfalfa (*Medicago sativa*)
- Agua destilada
- Suelo agrícola
- Piedra caliza

### 3.4.2. Materiales

- Lampa o pala para agricultura
- Recipientes para transportar suelo agrícola
- Bandejas de plástico de 50 cm de largo x 30 cm de ancho
- Placas de Petri
- Espátulas
- Pinzas aserradas
- Tijeras
- Piseta
- Macetas
- Micropipeta graduada de 5 – 50 µL

### 3.4.3. Equipos

- Balanza analítica de 0.0001 g de precisión
- Estufa para laboratorio
- Cámara de crecimiento vegetal
- Espectrómetro de masas con relación isotópica
- Medidor de pH para suelo

## 3.5. Procedimiento

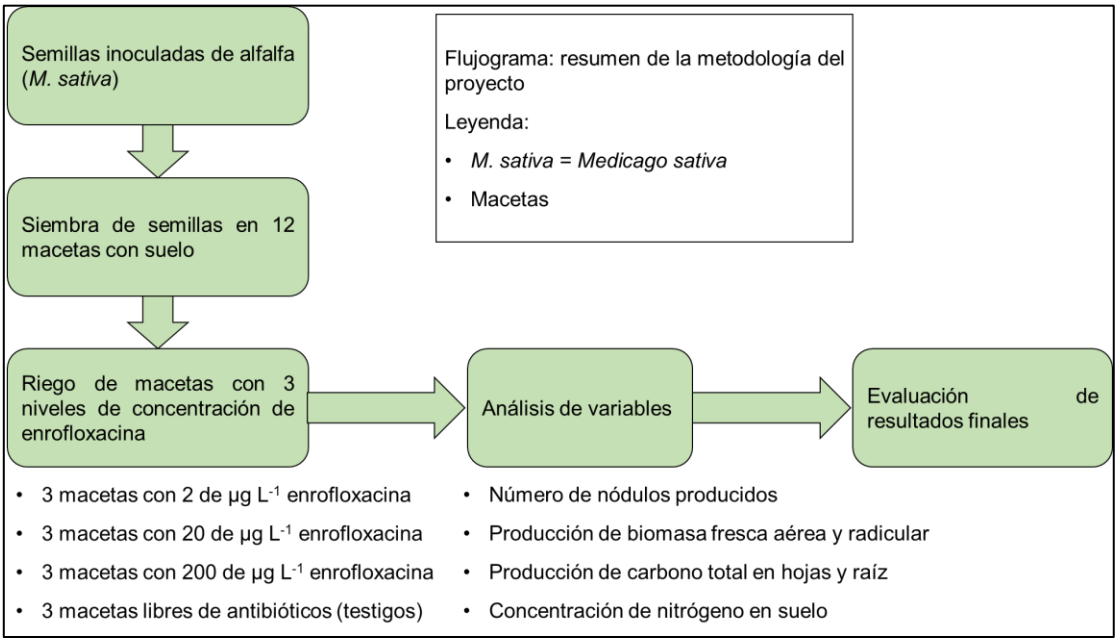



*Figura 12: Flujograma del proyecto*

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecotoxicología del Centro de Energía Nuclear y Agricultura (CENA), donde se obtuvo tierra agrícola proveniente de áreas de cultivo de Piracicaba, Sao Paulo, Brasil, esta zona presenta precipitaciones continuas lo que se convierte en su principal mecanismo de riego, se obtuvo el suelo a 30 cm de profundidad de la capa superficial del suelo que a su vez fue tamizado con malla N° ¼" para retirar materiales indeseados como pequeños materiales sólidos (Mendes et al., 2019). En una bandeja plana se realizó una mezcla uniforme de 1:1 entre el suelo recolectado y sustrato NPK (13-36-13 BASAPLANT - COMPO EXPERT°), se utilizaron 12 macetas (20 x 16 x 15 cm de ancho, alto y base respectivamente) a las que se les agregó 4 kg de la mezcla (suelo y sustrato) y se agregó 10 semillas inoculadas con *Rhizobium sp* a cada una de las macetas, posterior a ello se las trasladó a una cámara de crecimiento vegetativo donde se monitoreó las condiciones ambientales (temperatura promedio: 24.5 ± 2.5, humedad relativa entre 63 y 82.8 %, concentración de $CO^2$ entre 400 y 448 ppm, irradiación lumínica

durante 12 horas por día: 469 µmol $s^{-1}$ $m^{-2}$) donde se realizó el riego con 100 mL de agua tipo 2 cada 48 horas por 16 días, al finalizar esa etapa del riego se apreció el crecimiento de alfalfa (*M. sativa*) por lo cual se procedió a realizar el riego de 200 mL de agua con concentración de enrofloxacina (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$) cada 4 días durante 24 días (Gomes et al., 2020). Para el diseño experimental completamente al azar, los grupos fueron separados en 3 tratamientos para diferentes concentraciones (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$), distribuidos en 3 repeticiones y 1 testigo para cada tratamiento (Tabla 2), a los cuales se les aplicó el análisis estadístico ANOVA de un factor y posterior a ello se evaluaron las diferencias entre los resultados de los parámetros que se midieron (cantidad de nódulos, producción de biomasa fresca aérea y radicular en gramos, cantidad de carbono orgánico en gramos por kilogramos (g $Kg^{-1}$) de alfalfa (*M. sativa*) y nitrógeno contenido en suelo medido en gramos por kilogramos de suelo (g $Kg^{-1}$)) (Ju et al., 2019). La instalación y desarrollo del proyecto se llevó a cabo a partir de agosto, finalizando en diciembre, siendo este último mes donde se realizó la cosecha de las muestras.

*Tabla 2: Diseño experimental*

| **TESTIGOS** | **TRATAMIENTOS CON ENR (µg $L^{-1}$)** | | |
|---|---|---|---|
| | **2** | **20** | **200** |
| T - 1 | DB - 1 | DM - 4 | DA - 7 |
| T - 2 | DB - 2 | DM - 5 | DA - 8 |
| T - 3 | DB - 3 | DM - 6 | DA - 9 |

### 3.5.1. Ajuste de pH del suelo

El pH en suelo, resulta un factor que puede determinar la disponibilidad de nutrientes que la planta necesita para su desarrollo, siendo el valor ideal para la planta entre 6.0 y 6.9 de pH (Hernandez et al., 2011). Las bacterias asociadas

a plantas leguminosas necesitan un pH cercano al neutro, de tal forma, podrán realizar la fijación de nitrógeno para la planta (alfalfa) (Basigalup D. et al., 2007); por lo que, se tuvo que realizar una corrección del pH, debido a que el crecimiento temprano de alfalfa se vio interrumpido, sugiriendo que el pH pudo haber actuado negativamente, se utilizó piedra caliza para la corrección de acides considerando que el valor de saturación de las bases (V%) de la alfalfa debe ser superior al 95 % (Moreira et al., 2021).

- Densidad del suelo: aprox. 1,25 g/cm$^3$ -> 1250 kg/m$^3$ (*clase de textura: med-arg)

V2 = 95% (para el desarrollo de los cultivos)

V1 = Saturación de las bases del suelo (análisis químico)

- Corrección del pH

Método de saturación de la base

NC (t/ha) = [(V2 - V1) * T]/ (10 * PRNT)

NC (t/ha) = [(95 - 72) * 99,6]/ (10 * 70)

NC (t/ha) = 3,27

- Cantidad de suelo para el experimento: macetas: 35

Macetas: 35 * (3,5L) = 122,5 kg * (d= 1250)

= 0,1225 * 1,250 = 153,13 kg

Por ha

10.000 m$^2$ * 0,20 m = 2000m$^3$ * (1250)

3,27 t de piedra caliza -------- 2.500.000,00 kg

X ----------153,13 kg

X = 0,0002 t -> 0,2 kg -> 200 g de piedra caliza

### 3.5.2. Inoculación y proceso de crecimiento de alfalfa

Se recolectó suelo agrícola de 30 cm de profundidad de la capa superficial de campos de cultivos en Piracicaba (Sao Paulo – Brasil) y fueron tamizados con malla N° ¼" (Mendes et al., 2019), luego en una bandeja plana se realizó una mezcla uniforme de 1:1 entre el suelo recolectado y sustrato NPK (13-36-13 BASAPLANT - COMPO EXPERT°), 4 Kg de dicha mezcla fue agregada a cada una de las 12 macetas a las cuales se les sembró 10 semillas de alfalfa (*M. sativa*) inoculadas (*Rhizobium sp*) a 1 cm de profundidad; previamente las semillas fueron inoculadas transportándolas a una bandeja la cual se esterilizó, fueron esparcidas y se agregó 5 mL de melaza junto con 5 gr de fosfato para ser mezclados con el inoculante que contiene el microorganismo *Rhizobium sp* hasta lograr una consistencia pastosa, la bandeja con el insumo fue puesto a secar por 12 horas (Bernal G. et al., 2002), partiendo a las 19:00 hrs. del día 18 de octubre y finalizando a las 7:00 hrs. del día siguiente, a temperatura ambiente (21.9 °C a 27 °C) en oscuridad, esta mezcla con melaza ayuda a que el microorganismo se active una vez sembrado junto con la semilla en el suelo lo que maximiza la afinidad entre la bacteria con la planta de la alfalfa (Ju et al., 2019). Luego de la instalación del experimento, en octubre 19, Se procedió a realizar el riego con 100 mL de agua tipo 2 y al tercer día se pudo apreciar los primeros brotes dando inicio al desarrollo vegetativo (Basigalup D. et al., 2007).

En octubre 29 se realizó el raleo a la alfalfa (*M. sativa*) en las macetas para asegurar el crecimiento de las muestras más optimas y poder continuar con el riego de 100 mL de agua tipo 2 cada 48 horas durante 16 días. El 16 de

noviembre se procedió a realizar el riego con 200 mL agua tipo 2 agregando las concentraciones de enrofloxacina para cada tratamiento (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$) por cada 96 horas durante 24 días, las 96 horas corresponden a 4 días que será el margen de aplicación, siguiendo como guía estudios previos (Gomes et al., 2020). Las macetas se colocaron en una cámara de crecimiento vegetal del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro de Energía Nuclear y Agricultura de la Universidad de Sao Paulo – Brasil, donde se monitoreó las condiciones ambientales (temperatura promedio: 24.5 ± 2.5, humedad relativa entre 63 y 82.8 %, concentración de $CO^2$ entre 400 y 448 ppm, irradiación lumínica durante 12 horas por día: 469 µmol $s^{-1}$ $m^{-2}$).

### 3.5.3. Determinación de nódulos en raíz de alfalfa

Se realizó la siembra de semillas de alfalfa inoculadas con el microorganismo *Rhizobium sp* y luego de 55 días del sembrado, se realizó la cosecha de las plantas el 13 de diciembre cuando la alfalfa alcanzó una altura promedio de 51 cm de masa aérea y un promedio de 47 cm de longitud de raíz, para ello se retiró una muestra de alfalfa (*M. sativa*) de una maceta ajena al experimento y que fue sembrada al mismo tiempo que las muestras objetivo para realizar la medición (figura 13) (cabe resaltar que esta muestra solo sirvió para determinar si los objetivos ya estaban aptos para ser cosechados, no influye en los datos obtenidos); se realizó la cosecha de las muestras donde se procedió a limpiar las raíces y realizar el posterior conteo de nódulos (Carrasco et al., 2005).



*Figura 13: Medición de altura de masa aérea de alfalfa (fuente propia)*

Se procedió a retirar cuidadosamente las plantas aplicando una suave presión para desprender el suelo de las macetas, con ayuda de una bandeja se recolectó el suelo que se retiró las raíces de la alfalfa (*M. sativa*) (figura 14), al finalizar esta acción se las retiro a otra bandeja donde se aplicó agua destilada para limpiar las raíces y retirarles el excedente de suelo, se colocaron en bandejas por separado luego de su limpieza; utilizando pinzas y tijeras se procedió al conteo de nódulos, siguiendo el procedimiento utilizado en estudios previos (Pourbabaee et al., 2021). Este procedimiento se realizó en tres días por cada concentración, partiendo el 13 de diciembre y finalizando el 15 de diciembre, día 13 para las muestras a las que se les aplicó 2 µg $L^{-1}$, día 14 para las muestras de 20 µg $L^{-1}$ y día 15 para las muestras de 200 µg $L^{-1}$.



*Figura 14: Retiro de muestra de alfalfa de la maceta (fuente propia)*



*Figura 15: Remoción del suelo de la raíz de alfalfa (fuente propia)*

### 3.5.4. Determinación de biomasa de alfalfa

Para determinar la biomasa, se procedió a retirar las plantas de las macetas retirando cuidadosamente el suelo sobrante; para determinar la masa total de alfalfa, se realizó la suma del peso de la masa aérea y la masa radicular expresado en gramos, la parte superior de la planta y las raíces fueron cortadas para ser transportadas y pesadas individualmente con ayuda de placas petri a una balanza analítica donde se pesaron las muestras (figura 16). Tomando en consideración que cada muestra corresponde a una planta entera, el peso se realizó por separado tanto la masa aérea y la masa radicular, luego se realizó la suma para determinar el peso total (Wang et al., 2021). Este procedimiento se realizó en tres días por cada concentración, partiendo el 13 de diciembre y finalizando el 15 de diciembre, día 13 para las muestras a las que se les aplicó 2 µg $L^{-1}$, día 14 para las muestras de 20 µg $L^{-1}$ y día 15 para las muestras de 200 µg $L^{-1}$.

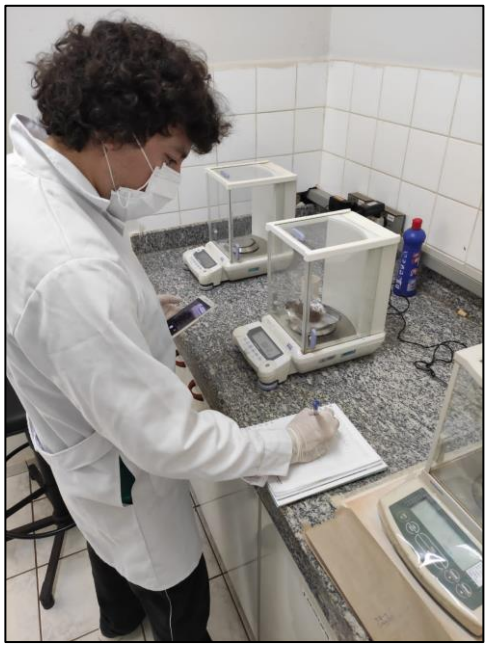


*Figura 16: Pesado de alfalfa (fuente propia)*

### 3.5.5. Determinación de carbono total en alfalfa

El inicio del procedimiento se dio el 16 de diciembre y finalizó el 17 de diciembre donde se prepararon las muestras y se trasportaron al laboratorio para su análisis. Para la determinación de carbono, se procedió a eliminar la humedad de las muestras, para ello, se colocaron en la estufa a 65 °C durante 24 horas, posteriormente se procedió a triturar las muestras de alfalfa hasta obtener un polvo fino para el análisis; el polvo fino que se obtuvo (1 gr de cada muestra) se sometió a 6 lavados de 15 mL de agua tipo 2, posteriormente se aplicó 2 lavados con 15 mL de acetonitrilo y al finalizar se colocaron en un agitador por 2 minutos, estas muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 10 minutos. El producto de la preparación se recogió en matraces volumétricos de 50 mL y 100 mL para ser completadas con acetonitrilo y agua respectivamente (Shen et al., 2021), los extractos orgánicos en el matraz de 50 mL se colocaron en un evaporador rotativo a 35°C para ser disueltos en 1 mL de metanol y los extractos acuosos contenidos en el matraz de 100 mL se disolvieron en 1 mL de metanol para luego ser combinadas. Para tomar las muestras finales, se disolvieron agregando 1 mL de acetonitrilo y agua respectivamente y se filtraron con ayuda de un filtro jeringa de 0.22 µm para ser almacenadas en tubos de ensayo (2 ml) de borosilicato ámbar (T. Li et al., 2021).

Luego de la preparación se alistaron las muestras a ser analizadas, para ello se tomó como referencia estudios previos que indican el principio de análisis de carbono, donde las muestras deben ser sometidas a combustión para que el carbono cambie de estado a gaseoso, para que pueda ser extraído por medio de conductos de cobre de alta pureza que será calentado con la finalidad de poder

eliminar el oxígeno y luego ser separados por medio de la columna cromatográfica (Hernandez et al., 2011). Las muestras se colocaron en columnas de estaño y transportadas al espectrómetro de masas con relación isotópica de marca **ThermoQuest-Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT; CA, EEUU)** conectado a un analizador elemental (**Carlo Erba modelo 1110; Milán, Italia);** este método ayudó a analizar las moléculas gaseosas introducidas al espectrómetro de masas que son arrastradas por un flujo gaseoso de helio, catalizado para ser convertidas en especies referenciales (Moreno et al., 2017).



*Figura 17: Muestras colocadas en estufa (fuente propia)*



*Figura 18: Tamizado de muestra de alfalfa triturada (fuente propia)*

### 3.5.6. Determinación de nitrógeno acumulado

El inicio del procedimiento se dio el 16 de diciembre y finalizó el 17 de diciembre donde se prepararon las muestras y se trasportaron al laboratorio para su análisis. Para ello se realizó el tamizado utilizando el cernidor con malla N° 100 para homogenizar el suelo, luego fueron colocados en sobres de papel y llevados a la estufa donde permanecieron 24 horas a 65 °C, posteriormente las muestras fueron molidas en un mortero (Chen et al., 2020), cada muestra de suelo se sometió a un lavado con 5 mL de agua tipo 2 y colocados en tubos de ensayo de vidrio donde se agregaron 4 mL de hidróxido de amonio para diluir las muestras, el agua tipo 2 fue evaporado mediante una estufa a 80 °C. Las muestras fueron disueltas en 1.2 mL de ácido clorhídrico para ser agitados en tubos de ensayo durante 10 segundos, posterior a ello, se les agregó 2 mL de cloroformo y fueron agitados durante 10 segundo para ser disueltos nuevamente en 200 mL de cloroformo, se pipetearon las muestras en tubos de ensayo de 300 mL, donde el volumen se redujo 100 mL aproximadamente a temperatura ambiente (21.9 °C a 27 °C) de 100 mL (Norlin et al., 2007).

Luego de la preparación se alistaron las muestras a ser analizadas, para ello las muestras de suelo fueron colocadas en cápsulas de estaño y se cargaron en un espectrómetro de masas de relación isotópica **ThermoQuest-Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT; CA, EE.UU.)** conectado a un analizador elemental (**Carlo Erba modelo 1110; Milán, Italia)** este método ayudó a analizar las moléculas gaseosas introducidas al espectrómetro de masas que son arrastradas por un flujo gaseoso de helio, catalizado para ser convertidas en especies referenciales y determinar el nitrógeno total en suelo (Moreira et al., 2021).



*Figura 19: Tamizado de muestras de suelo (fuente propia)*

### 3.6. Análisis de datos

Para el análisis de datos se empleó el programa estadístico informático SPSS 17.0 (Chicago, IL, EE. UU.) donde se determinaron las medias de los datos, desviación estándar entre otros datos necesarios para determinar la significancia del efecto del residuo de enrofloxacina (tabla 23). Luego para cada objetivo se siguió con la prueba de normalidad como se aprecia en la tabla 24 para determinar si los datos siguen una distribución normal o diferente a la normal y de acuerdo a los resultados poder emplear una prueba estadística paramétrica como el Análisis de Varianza (ANOVA). Posterior se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas con el estadístico de Levene que ayuda a trabajar con más de dos grupos de comparación (tabla 25) (en este caso se tiene más de dos tratamientos), esto va acompañado de la prueba estadística de Análisis de Varianza de un factor (ANOVA de un factor) que permite comparar más de dos grupos de tratamiento y determinar si su resultado o efecto es significativo o no significativo utilizando el grado de significancia de 0.05 (5%) con el estadístico de Fisher (F) (tabla 26). Al determinar un efecto significativo en los tratamientos con enrofloxacina (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$), el siguiente

paso fue identificar el o los grupos que presentaron dicho efecto significativo y para ello se emplearon las pruebas Post Hoc de HSD de Tukey y Duncan (tabla 27) para brindar un mejor panorama al identificar las diferencias entre los tratamientos. Cabe resaltar que la significancia en el efecto de enrofloxacina es determinado por la prueba de ANOVA de un factor.

## IV. RESULTADOS

Los datos recopilados de las mediciones de los objetivos (cantidad de nódulos producidos en raíz, producción de biomasa aérea y radicular, cantidad de carbono en alfalfa y cantidad de nitrógeno acumulado en suelo) mostraron diferencias entre los tratamientos y el grupo testigo (tabla 3). Se aprecia una diferencia numérica luego de aplicar enrofloxacina en diferentes concentraciones (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$), es por ello que se aplicó los supuestos de prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y prueba de homogeneidad de varianzas de Levene como requisitos previos para el análisis de varianza de un factor y determinar la significancia de estas diferencias, evidenciando que la presencia de enrofloxacina presenta un efecto relevante. Posteriormente se aplicó las pruebas de Post Hoc HSD de Tukey y la prueba de Duncan que ayudaron a verificar que grupo de tratamiento con enrofloxacina se diferencia del grupo testigo.

*Tabla 3: Resultados del efecto de diferentes concentraciones de enrofloxacina (ENR) (fuente propia)*

| VARIABLES | TESTIGO | TRATAMIENTOS CON ENR (µg $L^{-1}$) | | | PROMEDIO |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 | 20 | 200 | |
| Nódulos de raíz (unidad) | 520 ± 141.5 | 86 ± 20.3 | 89.5 ± 37.5 | 44 ± 14.1 | 208.5 ± 226.3 |
| Masa aérea (gr) fresco | 7.7140 ± 4.3 | 5.4347 ± 0.6 | 5.8983 ± 3.0 | 4.8017 ± 1.3 | 5.9622 ± 2.6 |
| Masa radicular fresco (gr) | 7.3990 ± 1.2 | 2.2357 ± 0.8 | 2.8780 ± 1.8 | 1.8697 ± 0.8 | 3.2498 ± 2.3 |
| Longitud de raíz (cm) | 40,5000 ± 9,1 | 26,0000 ± 2,0 | 23,3333 ± 0,6 | 24,0000 ± 1,8 | 27,3636 ± 7,3 |
| Carbono tallos y hojas (g $Kg^{-1}$) | 426.82 ± 5.1 | 407.3567 ± 11.0 | 412.1850 ± 11.3 | 400.6467 ± 6.8 | 411.7127 ± 12.7 |
| Carbono raíz (g $Kg^{-1}$) | 272.97 ± 42.0 | 221.6633 ± 28.3 | 219.67 ± 60.5 | 201.8733 ± 45.6 | 229.0442 ± 47.7 |
| Nitrógeno suelo (g $kg^{-1}$) | 1.7900 ± 0.4 | 1.9700 ± 0.1 | 1.9367 ± 0.3 | 2.0333 ± 0.3 | 1.9325 ± 0.2 |

## 4.1. Cantidad de nódulos en raíz

*Tabla 4: Resultados de nódulos en raíz (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 520,0000 | 141,53445 | 81,71495 | 168,4089 | 871,5911 | 392,00 | 672,00 |
| DB (2µg/L) | 3 | 86,0000 | 20,29778 | 11,71893 | 35,5775 | 136,4225 | 64,00 | 104,00 |
| DM (20 µg/L) | 2 | 89,5000 | 37,47666 | 26,50000 | -247,2144 | 426,2144 | 63,00 | 116,00 |
| DA (200 µg/L) | 2 | 44,0000 | 14,14214 | 10,00000 | -83,0620 | 171,0620 | 34,00 | 54,00 |
| Total | 10 | 208,5000 | 226,33567 | 71,57362 | 46,5892 | 370,4108 | 34,00 | 672,00 |

## Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 5: ANOVA - nódulos en raíz (fuente propia)*

**ANOVA de un factor**

Nódulos en raíz

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Inter-grupos | 418558,000 | 3 | 139519,333 | 19,700 | 0,002 |
| Intra-grupos | 42492,500 | 6 | 7082,083 | | |
| Total | 461050,500 | 9 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.002 es menor a 0.05, entonces se rechaza la Ho y se concluye que al menos uno de los tratamientos es diferente.

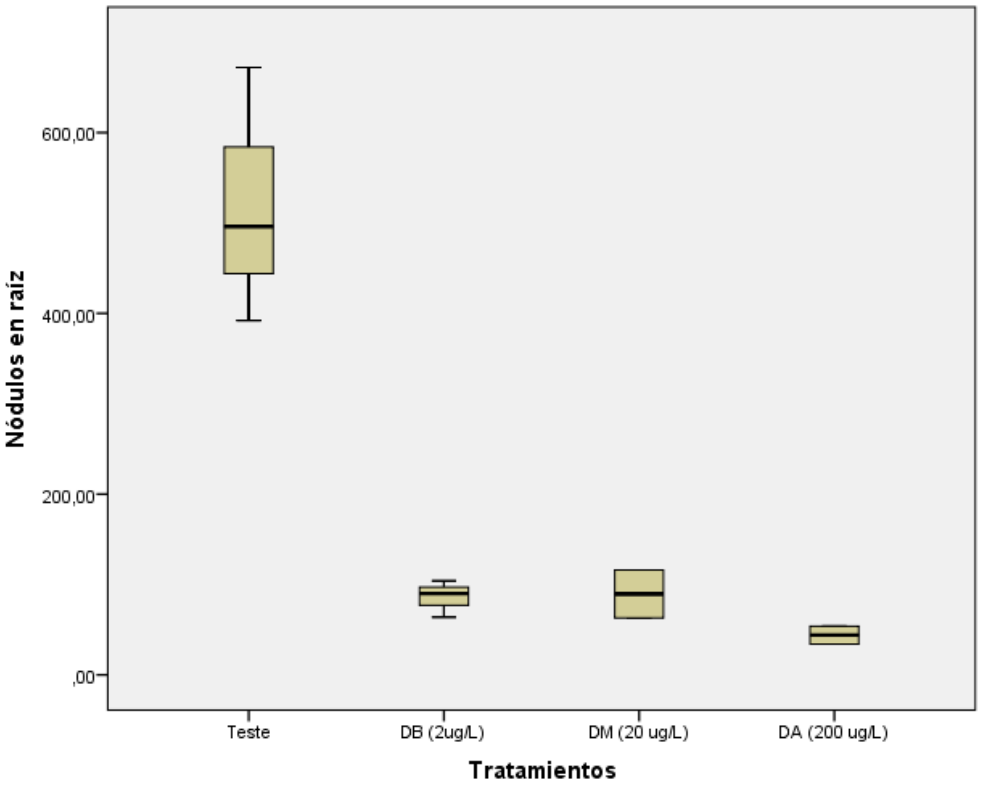



*Figura 20: Comparación de resultados de tratamiento - cantidad de nódulos (fuente propia)*

La figura 20 muestra una diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, sin embargo, se realizó una prueba posterior (Post Hoc) para verificar el contraste de las medias y determinar que grupo de tratamiento se diferencia significativamente del grupo testigo.

## PRUEBAS DE POST HOC

Para grupos homogéneos

*Tabla 6: Prueba post hoc - nódulos en raíz (fuente propia)*

| | | | **Nódulos en raíz** | |
|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | N | Subconjunto para-alfa = 0.05 | |
| | | | 1 | 2 |
| HSD de Tukey[a,b] | DA (200 µg/L) | 2 | 44,0000 | |
| | DB (2 µg/L) | 3 | 86,0000 | |
| | DM (20 µg/L) | 2 | 89,5000 | |
| | Testigo | 3 | | 520,0000 |
| | Sig. | | 0,931 | 1,000 |
| Duncan[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 44,0000 | |
| | DB (2µg/L) | 3 | 86,0000 | |
| | DM (20 µg/L) | 2 | 89,5000 | |
| | Testigo | 3 | | 520,0000 |
| | Sig. | | 0,587 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,400.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Dado que existe al menos un tratamiento diferente al testigo, se aplicó la prueba Post Hoc para verificar que grupo de tratamiento es diferente, para ello se utilizó la prueba HSD de Tukey y la prueba de Duncan para comparar sus resultados de agrupación y verificar que subconjunto se adapta mejor a la figura 20.

- La prueba HSD de Tukey agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.
- La prueba Duncan agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.

Ambas pruebas indican que los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) se diferencian del grupo testigo. Cabe resaltar que la prueba de HSD de Tukey y la prueba de Duncan se utilizaron para brindar un mejor panorama y de tal forma, poder determinar que tratamiento se diferencia del testigo.

## 4.2. Masa radicular y aérea en condición fresco

### 4.2.1. Masa aérea

*Tabla 7: Resultados de masa aérea (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 7,7140 | 4,29230 | 2,747816 | -2,9487 | 18,3767 | 3,09 | 11,57 |
| DB (2 µg/L) | 3 | 5,4347 | 0,63558 | 0,36695 | 3,8558 | 7,0135 | 4,81 | 6,08 |
| DM (20 µg/L) | 3 | 5,8983 | 2,99218 | 1,72754 | -1,5347 | 13,3313 | 2,60 | 8,43 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 4,8017 | 1,34585 | 0,77703 | 1,4584 | 8,1449 | 3,70 | 6,30 |
| Total | 12 | 5,9622 | 2,58102 | 0,74508 | 4,3223 | 7,6021 | 2,60 | 11,57 |

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 8: ANOVA - masa aérea (fuente propia)*

| **ANOVA de un factor** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Fresco - Masa Aérea (gr) | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 14,094 | 3 | 4,698 | 0,635 | 0,613 |
| Intra-grupos | 59,185 | 8 | 7,398 | | |
| Total | 73,279 | 11 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.613 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre los tratamientos.

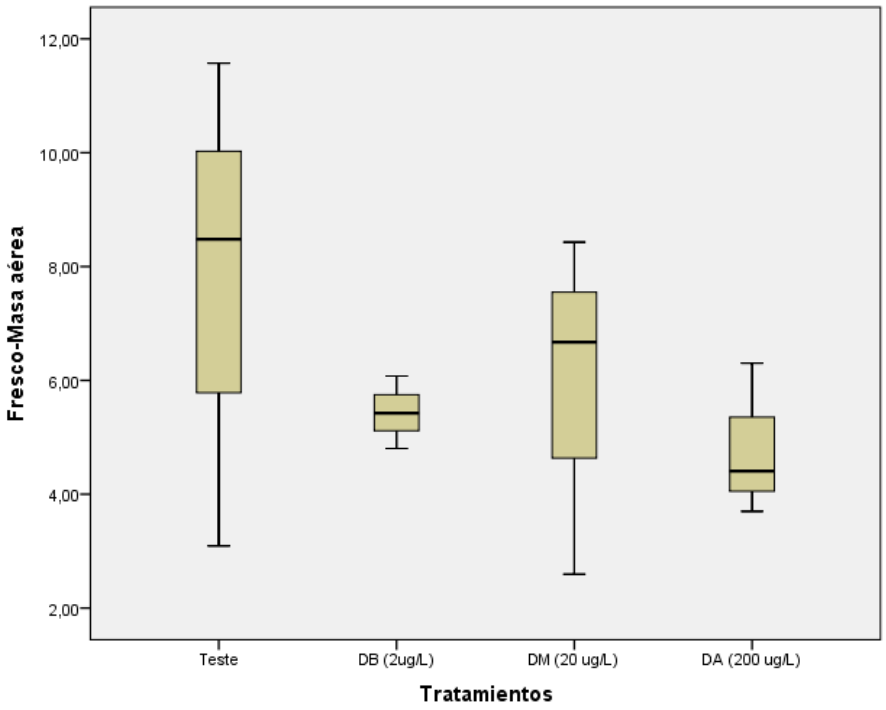



*Figura 21: Comparación de resultados de tratamiento - masa aérea (fuente propia)*

La figura 21 muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, ya que los valores de las medias se encuentran dentro de los rangos mínimos y máximos de la barra

testigo que se muestra en el gráfico de la figura 21, esto indica que no se requiere realizar una prueba posterior (Post Hoc).

### 4.2.2. Masa radicular

*Tabla 9: Resultados de masa radicular (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 2 | 7,3990 | 1,25724 | 0,88900 | -3,8968 | 18,6948 | 6,51 | 8,29 |
| DB (2µg/L) | 3 | 2,2357 | 0,77818 | 0,44928 | 0,3026 | 4,1688 | 1,70 | 3,13 |
| DM (20 µg/L) | 3 | 2,8780 | 1,85281 | 1,06972 | -1,7246 | 7,4806 | 1,01 | 4,71 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 1,8697 | 0,78679 | 0,45425 | -0,0848 | 3,8242 | 1,38 | 2,78 |
| Total | 11 | 3,2498 | 2,33542 | 0,40416 | 1,6809 | 4,8188 | 1,01 | 8,29 |

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 10: ANOVA - masa radicular (fuente propia)*

| **ANOVA de un factor** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Fresco-Masa radicular | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 43,646 | 3 | 14,549 | 9,347 | 0,008 |
| Intra-grupos | 10,896 | 7 | 1,557 | | |
| Total | 54,542 | 10 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.008 es menor a 0.05, entonces se rechaza la Ho y se concluye que al menos uno de los tratamientos es diferente.

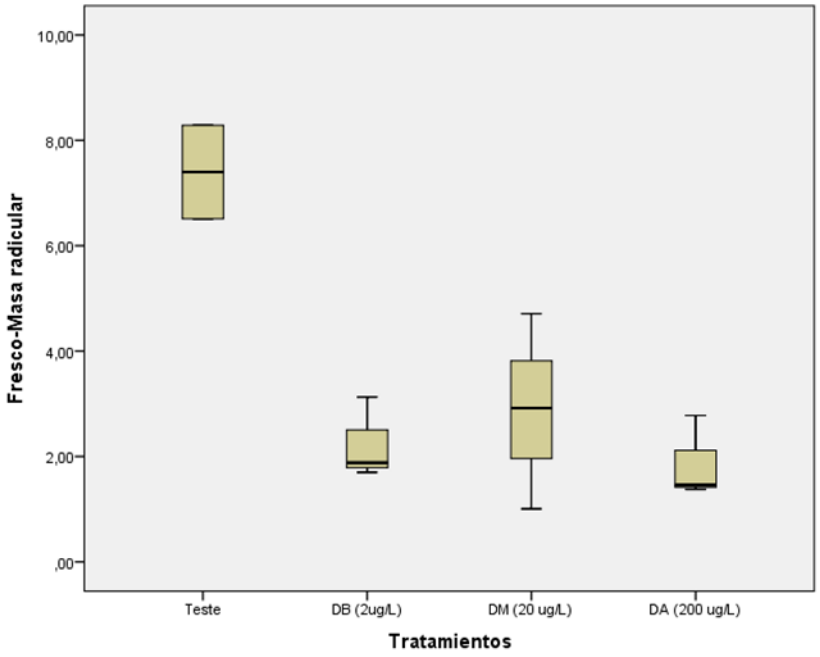



*Figura 22: Comparación de resultados de tratamiento - masa radicular (fuente propia)*

La figura 22 muestra una diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, sin embargo, se realizó una prueba posterior (Post Hoc) para verificar el contraste de las medias y determinar que grupo de tratamiento se diferencia significativamente del grupo testigo.

## PRUEBAS DE POST HOC

Para grupos homogéneos

*Tabla 11: Prueba post hoc - masa radicular*

| | Fresco-Masa radicular | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | N | Subconjunto para-alfa = 0.05 | |
| | | | 1 | 2 |
| HSD de Tukey[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 1,8697 | |
| | DB (2 µg/L) | 3 | 2,2357 | |
| | DM (20 µg/L) | 3 | 2,8780 | |
| | Testigo | 2 | | 7,3990 |
| | Sig. | | 0,789 | 1,000 |
| Duncan[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 1,8697 | |
| | DB (2µg/L) | 3 | 2,2357 | |
| | DM (20 µg/L) | 3 | 2,8780 | |
| | Testigo | 2 | | 7,3990 |
| | Sig. | | 0,399 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,667.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Dado que existe al menos un tratamiento diferente al testigo, se aplicó la prueba Post Hoc para verificar que grupo de tratamiento es diferente, para ello se utilizó la prueba HSD de Tukey y la prueba de Duncan para comparar sus resultados de agrupación y verificar que subconjunto se adapta mejor a la figura 22.

- La prueba HSD de Tukey agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.
- La prueba Duncan agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.

Ambas pruebas indican que los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) se diferencian del grupo testigo. Cabe resaltar que la prueba de HSD de Tukey y la prueba de Duncan se utilizaron para brindar un mejor panorama y de tal forma, poder determinar que tratamiento se diferencia del testigo.

### 4.2.3. Longitud de raíz en alfalfa

*Tabla 12: Resultados de longitud de raíz (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 2 | 40,5000 | 9,19239 | 6,50000 | -42,0903 | 123,0903 | 34,00 | 47,00 |
| DB (2µg/L) | 3 | 26,0000 | 2,00000 | 1,15470 | 21,0317 | 30,9683 | 24,00 | 28,00 |
| DM (20 µg/L) | 3 | 23,3333 | 0,57735 | 0,33333 | 21,8991 | 24,7676 | 23,00 | 24,00 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 24,0000 | 1,73205 | 1,00000 | 19,6973 | 28,3027 | 22,00 | 25,00 |
| Total | 11 | 27,3636 | 7,29757 | 2,20030 | 22,4611 | 32,2662 | 22,00 | 47,00 |

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 13: ANOVA - longitud de raíz (fuente propia)*

**ANOVA de un factor**

Longitud de raíz

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Inter-grupos | 433,379 | 3 | 144,460 | 10,197 | 0,006 |
| Intra-grupos | 99,167 | 7 | 14,167 | | |
| Total | 532,545 | 10 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.006 es menor a 0.05, entonces se rechaza la Ho y se concluye que al menos uno de los tratamientos es diferente.

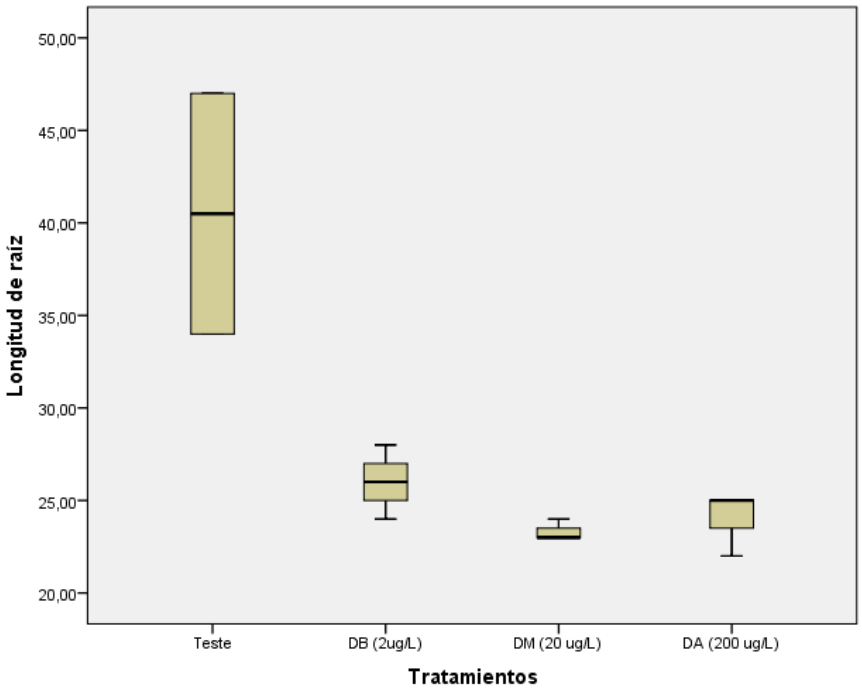



*Figura 23: Comparación de resultados de tratamiento - longitud de raíz (fuente propia)*

La figura 23 muestra una diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, sin embargo, se realizó una prueba posterior (Post Hoc) para verificar el contraste de las medias y determinar que grupo de tratamiento se diferencia significativamente del grupo testigo.

## PRUEBAS DE POST HOC

Para grupos homogéneos

*Tabla 14: Prueba post hoc - longitud de raíz (fuente propia)*

| | Longitud de raíz | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | N | Subconjunto para-alfa = 0.05 | |
| | | | 1 | 2 |
| HSD de Tukey[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 23,3333 | |
| | DB (2 µg/L) | 3 | 24,0000 | |
| | DM (20 µg/L) | 3 | 26,0000 | |
| | Testigo | 2 | | 40,5000 |
| | Sig. | | 0,844 | 1,000 |
| Duncan[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 23,3333 | |
| | DB (2µg/L) | 3 | 24,0000 | |
| | DM (20 µg/L) | 3 | 26,0000 | |
| | Testigo | 2 | | 40,5000 |
| | Sig. | | 0,456 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,667.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Dado que existe al menos un tratamiento diferente al testigo, se aplicó la prueba Post Hoc para verificar que grupo de tratamiento es diferente, para ello se utilizó la prueba HSD de Tukey y la prueba de Duncan para comparar sus resultados de agrupación y verificar que subconjunto se adapta mejor a la figura 23.

- La prueba HSD de Tukey agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.
- La prueba Duncan agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.

Ambas pruebas indican que los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) se diferencian del grupo testigo. Cabe resaltar que la prueba de HSD de Tukey y la prueba de Duncan se utilizaron para brindar un mejor panorama y de tal forma, poder determinar que tratamiento se diferencia del testigo.

## 4.3. Carbono total en alfalfa

### 4.3.1. Carbono total en hojas

*Tabla 15: Resultados de carbono en hojas (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 426,8200 | 5,09129 | 2,93946 | 414,1725 | 439,4675 | 421,04 | 430,64 |
| DB (2 µg/L) | 3 | 407,3567 | 11,01746 | 6,36093 | 379,9878 | 434,7256 | 397,59 | 419,30 |
| DM (20 µg/L) | 2 | 412,1850 | 11,29250 | 7,98500 | 310,7260 | 513,6440 | 404,20 | 420,17 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 400,6467 | 6,75803 | 3,90175 | 383,8588 | 417,4346 | 396,70 | 408,45 |
| Total | 11 | 411,7127 | 12,73934 | 3,84106 | 403,1543 | 420,2711 | 396,70 | 430,64 |

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 16: ANOVA - carbono en hojas (fuente propia)*

| **ANOVA de un factor** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Hojas - Carbono | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 1109,434 | 3 | 369,811 | 5,042 | 0,036 |
| Intra-grupos | 513,474 | 7 | 73,353 | | |
| Total | 1622,908 | 10 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.036 es menor a 0.05, entonces se rechaza la Ho y se concluye que al menos uno de los tratamientos es diferente.

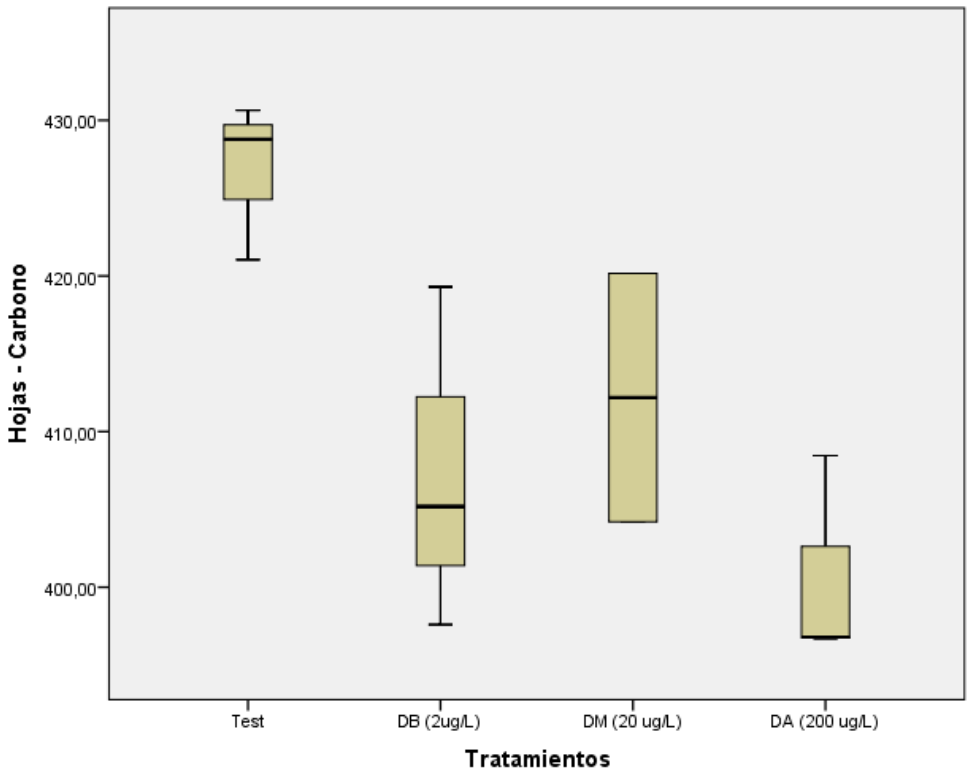



*Figura 24: Comparación de resultados de tratamiento – contenido de carbono en hojas (fuente propia)*

La figura 24 muestra una diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, sin embargo, se realizó una prueba posterior (Post Hoc) para verificar el contraste de las medias y

determinar que grupo de tratamiento se diferencia significativamente del grupo testigo.

**PRUEBAS DE POST HOC**

Para grupos homogéneos

*Tabla 17: Prueba post hoc - carbono en hojas (fuente propia)*

| | **Hojas - Carbono** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | N | Subconjunto para-alfa = 0.05 | |
| | | | 1 | 2 |
| HSD de Tukey[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 400,6467 | |
| | DB (2 µg/L) | 3 | 407,3567 | 407,3567 |
| | DM (20 µg/L) | 2 | 412,1850 | 412,1850 |
| | Testigo | 3 | | 426,8200 |
| | Sig. | | 0,458 | 0,123 |
| Duncan[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 400,6467 | |
| | DB (2µg/L) | 3 | 407,3567 | |
| | DM (20 µg/L) | 2 | 412,1850 | 412,1850 |
| | Testigo | 3 | | 426,8200 |
| | Sig. | | 0,178 | 0,089 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,667.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Dado que existe al menos un tratamiento diferente al testigo, se aplicó la prueba Post Hoc para verificar que grupo de tratamiento es diferente, para ello se utilizó la prueba HSD de Tukey y la prueba de Duncan para comparar sus resultados de agrupación y verificar que subconjunto se adapta mejor a la figura 24.

- La prueba HSD de Tukey agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y en el subconjunto 2 se agrupan los tratamientos DB, DM y Testigo.

- La prueba Duncan agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y en el subconjunto 2 se agrupan los tratamientos DM y testigo.

Para Tukey, el subconjunto 1 agrupa a los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) diferenciándolos del grupo testigo sin embargo, en el subconjunto 2 agrupa los tratamientos DB, DM y el testigo, esto indica que para la prueba de Tukey estos tratamientos pueden ser similares ya que sus rangos mínimos y máximos están próximos (figura 24); haciendo un contraste con los resultados de la figura 24, se aprecia que no guarda similitud ya que para determinar que tratamiento se diferencia del testigo, las medias deben estar alejadas de la barra que corresponde al grupo testigo mostrado en el gráfico, por lo que la prueba de Tukey para este caso no explica la diferencia entre los tratamientos del subconjunto 2.

Para Duncan, el subconjunto 1 agrupa a los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) diferenciándolos del grupo testigo, sin embargo, en el subconjunto 2 agrupa los tratamientos DM y testigo, esto indica que para la prueba de Duncan estos tratamientos pueden ser similares ya que sus rangos mínimos y máximos están próximos (figura 24); haciendo un contraste con los resultados de la figura 24, se aprecia que guarda similitud ya que para determinar que tratamiento se diferencia del testigo, las medias deben estar alejadas de la barra que corresponde al grupo testigo mostrado en el gráfico. La prueba de Duncan al ser una prueba que compara las medias de los tratamientos, se aproxima mejor a lo mostrado en la figura 24 e indica que los tratamientos DB y DA se diferencian con el grupo testigo, en contraste con la prueba de Tukey que indica solamente un tratamiento diferente al testigo. Cabe resaltar que la prueba de HSD de Tukey y la prueba de Duncan se utilizaron para brindar un mejor panorama y de tal forma, poder determinar que tratamiento se diferencia del testigo.

### 4.3.2. Carbono total en raíz

*Tabla 18: Resultados de carbono en raíz (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 272,9700 | 41,91500 | 24,19964 | 168,8474 | 377,0926 | 236,58 | 318,80 |
| DB (2 µg/L) | 3 | 221,6633 | 28,25705 | 16,31422 | 151,4689 | 291,8577 | 193,99 | 250,47 |
| DM (20 µg/L) | 3 | 219,6700 | 60,45113 | 34,90147 | 69,5011 | 369,8389 | 183,23 | 289,45 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 201,8733 | 45,55450 | 26,30090 | 88,7097 | 315,0370 | 159,92 | 250,33 |
| Total | 12 | 229,0442 | 47,67314 | 13,76205 | 198,7541 | 259,3342 | 159,92 | 318,80 |

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 19: ANOVA - carbono en raíz (fuente propia)*

| **ANOVA de un factor** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Raiz - Carbono | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 8430,254 | 3 | 2810,085 | 1,357 | 0,323 |
| Intra-grupos | 16569,758 | 8 | 2071,220 | | |
| Total | 25000,012 | 11 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.323 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre los tratamientos.

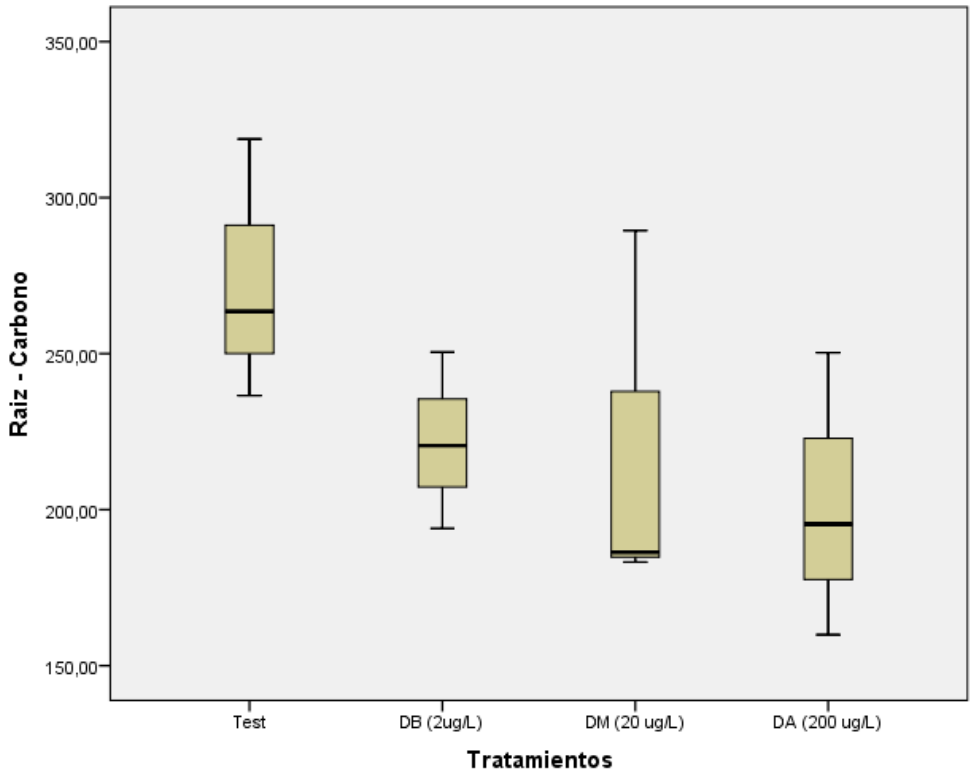



*Figura 25: Comparación de resultados de tratamiento – contenido de carbono en raíz (fuente propia)*

La figura 25 muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, a pesar de que las medias de los tratamientos (DB, DM y DA) no se encuentran dentro de los rangos mínimos y máximos del grupo testigo, existe una alineación entre los rangos máximos de los tratamientos y la barra testigo que muestra el gráfico de la figura 25, esto indica que no existe una

diferencia significativa y por ello, no se requiere realizar una prueba posterior (Post Hoc).

## 4.4. Nitrógeno acumulado en suelo

*Tabla 20: Resultados de nitrógeno en suelo (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 1,7900 | 0,35553 | 0,20526 | 0,9068 | 2,6732 | 1,51 | 2,19 |
| DB (2 µg/L) | 3 | 1,9700 | 0,11136 | 0,06429 | 1,6934 | 2,2466 | 1,85 | 2,07 |
| DM (20 µg/L) | 3 | 1,9367 | 0,26858 | 0,15506 | 1,2695 | 2,6038 | 1,63 | 2,13 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 2,0333 | 0,29670 | 0,17130 | 1,2963 | 2,7704 | 1,72 | 2,31 |
| Total | 12 | 1,9325 | 0,25111 | 0,07249 | 1,7730 | 2,0920 | 1,51 | 2,31 |

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 21: ANOVA - nitrógeno en suelo (fuente propia)*

| **ANOVA de un factor** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Suelo - Nitrógeno | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 0,096 | 3 | 0,032 | 0,427 | 0,739 |
| Intra-grupos | 0,598 | 8 | 0,075 | | |
| Total | 0,694 | 11 | | | |
| Total | 461050,500 | 9 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.739 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre los tratamientos.

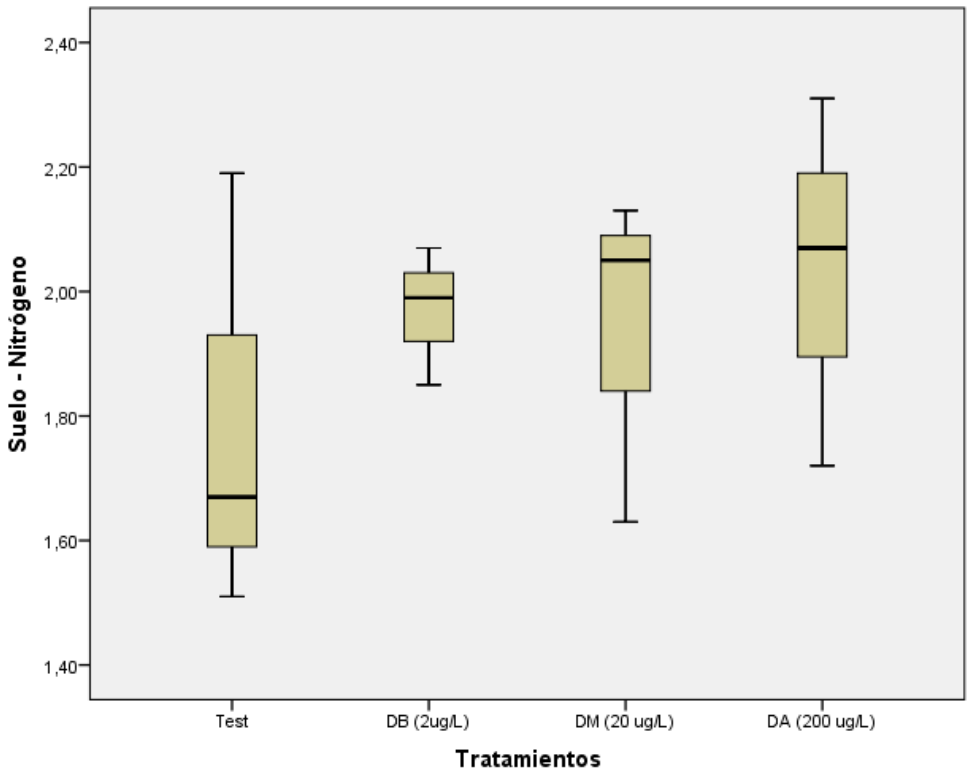



*Figura 26: Comparación de resultados de tratamiento - contenido de nitrógeno en suelo (fuente propia)*

La figura 26 muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, ya que los valores de las medias se encuentran dentro de los rangos mínimos y máximos de la barra testigo que se muestra en el gráfico de la figura 26, esto indica que no se requiere realizar una prueba posterior (Post Hoc).

# V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## 5.1. Efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de nódulos producidos en raíz de alfalfa

Se evidencia una reducción significativa en la cantidad de nódulos formados en las raíces de alfalfa, el gráfico de la figura 20 muestra una diferencia entre los tratamientos y el grupo testigo luego de la aplicación de diferentes concentraciones de enrofloxacina (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$), tomando como referencia estudios realizados con anterioridad (Gomes et al., 2020); este análisis sugiere que la presencia de contaminantes en el ambiente puede disminuir la formación de nódulos (Pourbabaee et al., 2021), como se muestran en los resultados de las medias de la tabla 4, lo que indica que la presencia de enrofloxacina pueda intervenir luego de ingresar y acumularse en el sistema del suelo (Chung et al., 2017). La reducción de la cantidad de nódulos da indicios del efecto de enrofloxacina, ya que estaría afectando a microorganismos benéficos que están presentes en la formación de estos órganos en la raíz de la planta (Xu et al., 2021), por consiguiente, la población de microorganismos naturales se vería disminuida, un dato aparte es que la presencia del residuo de antibiótico también daría pase a la aparición de genes de resistencia en microorganismos no benéficos que entrarían en competencia con las bacterias benéficas *Rhizobium sp* (Schierstaedt et al., 2020).

La formación de nódulos en la raíz de alfalfa (*M. sativa*) se da por la simbiosis de la planta leguminosa y el microorganismo benéfico (*Rhizobium sp*) sin embargo, la intromisión de enrofloxacina provocó una disminución como se aprecia en la tabla 4, donde la muestra testigo presentó un valor medio de 520 ± 141.5 (unidades de nódulos) y luego de aplicar las concentraciones de enrofloxacina (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$) la cantidad de nódulos formados en raíz se redujo en 86 ± 20.3, 89.5 ± 37.5 y 44 ± 14.1 respectivamente y las pruebas Post Hoc (prueba HSD de Tukey y

prueba de Duncan) (tabla 6) identificaron que la aplicación de las mencionadas concentraciones se diferencian del grupo testigo. Estos resultados indican que concentraciones elevadas de enrofloxacina presenta un efecto mayor en la disminución de formación de nódulos ya que estudios previos muestran que los residuos de dicho antibiótico interviene en la reproducción de microorganismos benéficos (*Rhizobium sp*) (Yang et al., 2019), ya que la enrofloxacina posee un efecto denominado bacteriostasis impidiendo que las bacterias se reproduzcan, manteniendo su número y cumpliendo su ciclo de vida sin decendencias (Liu et al., 2020), esto indica que el efecto bacteriostasis actúa sobre el ADN girasa cuya función es permitir la recombinación, transcripción y replicación de los genes de microorganismos (Papich et al., 2021). Por lo que, la aplicación de diferentes concentraciones (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$) de enrofloxacina presentan un efecto negativo en los microorganismos benéficos impidiendo así la formación de nódulos en las raíces de leguminosas

Las plantas leguminosas como la alfalfa, secretan una sustancia por medio de las raíces, siendo un atrayente para bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium sp*) (Ferguson et al., 2010), esta fijación se da gracias a la enzima nitrogenasa, para que la planta pueda aprovechar el nitrógeno atmosférico que se convierten en nitrato para ser aprovechado (Graham et al., 2003); sin embargo, la presencia de contaminantes en suelo puede interferir en esta captación, ya que al afectar a los microorganismos, impediría la formación de nódulos necesarios para este proceso (Pajuelo et al., 2008), esta intervención por parte del contaminante, pudiera reducir la cantidad de nitrógeno fijado en la planta por medio de las raíces (Anderson et al., 2004), de tal forma, este elemento quedaría libre en el suelo, pudiendo intervenir en el pH y por consiguiente acidificándolo (MacKenzie et al., 2020), esto debido a que pudiera combinarse con el nitrógeno presente en el abono que se utiliza en la agricultura (Lee et al., 2018); a largo plazo, estas condiciones

desfavorables, presentarían un efecto de deterioro a la calidad del suelo (Huang et al., 2019), además, estas condiciones pueden favorecer a la aparición de hongos patógenos, presentando interferencia en el ciclo del carbono (Zhou et al., 2016).

Estas implicaciones ambientales, pudieran ser consecuencia de la presencia del residuo de enrofloxacina presente en suelo, ya que el estudio reflejó una disminución del 85.93 % (gráfico 1) del total de nódulos formados, comparado con las muestras testigo, está disminución porcentual es significativa como se aprecia en el gráfico de la figura 20.

## 5.2. Efecto del residuo de Enrofloxacina en la producción de biomasa fresca aérea y radicular de alfalfa

El análisis muestra que la biomasa aérea de alfalfa tuvo una reducción del 30.28 % en total comparado con el grupo testigo (gráfico 2), sin embargo el análisis estadístico ANOVA de un factor indica que dicha reducción no es significativa (tabla 8), el gráfico de la figura 21 muestra que los rangos de los tratamientos se encuentran dentro de los rangos del grupo testigo, esto indica que si bien hubo reducción en la biomasa aérea, este efecto no representaría significancia por la presencia de enrofloxacina. La alfalfa pudo desarrollar su masa a pesar de las condiciones desfavorables (Zhang et al., 2021), la variedad de nutrientes puede favorecer al forraje de la alfalfa, ya que puede aprovechar la disponibilidad de insumos en el suelo, incluso cuando las condiciones sean adversas (Fan et al., 2016), ayudando así a que la masa aérea tenga un crecimiento normal aparente, ya que la planta pudiera captar los nutrientes de la parte superior de la raíz (Moshiri et al., 2019), indicando que el residuo de enrofloxacina, puede tener efectos en distintos factores dependiendo de la planta (Seo et al., 2010).

Sin embargo, la raíz al estar expuesta directamente a agentes externos como residuos de antibióticos pueda verse afectada su

crecimiento ya que, estos residuos se alojarían en esta zona interactuando e interfiriendo con la simbiosis entre alfalfa y microorganismo (Kong et al., 2007). Luego de la aplicación de enrofloxacina la biomasa radicular tuvo una reducción del 68.53 % (gráfico 3), esto sugiere que la presencia del antibiótico tiene un efecto que interfiere en el crecimiento de la raíz (Gomes et al., 2020), el análisis estadístico ANOVA de un factor indica que esta reducción es significativa (tabla 10) donde el peso de la masa radicular del grupo testigo fue de 7.3990 ± 1.2 gramos y tuvo una reducción de 2.2357 ± 0.8, 2.8780 ± 1.8 y 1.8697 ± 0.8 gramos por cada tratamiento con enrofloxacina aplicado (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente). Estudios previos indican que el crecimiento radicular está estimulado por las funciones de metabolismo que poseen las fitohormonas como la auxina (Cho et al., 2021), esto sugiere que agentes externos podrían provocar estrés en la planta que dificultaría el crecimiento radicular (Bücker-Neto et al., 2017).

El estrés en la planta es ocasionado por unas moléculas denominadas Especies Reactivas de Oxígeno (ROS por su nombre en inglés), que tendrían un efecto de deterioro celular y por consiguiente la auxina al estar presente en la célula vegetal se vería afectada su función como promotora de crecimiento vegetativo (Czarnocka et al., 2018), estas condiciones desfavorables, supondrían un efecto negativo en la formación del sistema radicular y en la biomasa de la planta minimizando así su desarrollo (Cho et al., 2021). Cabe mencionar que otro indicativo del crecimiento radicular es la longitud de la raíz, que en este caso luego de aplicar los tratamientos con enrofloxacina, se evidenció una reducción significativa en su longitud como se aprecia en el gráfico de la figura 23, por lo tanto esta disminución en la formación radicular debilitaría la estabilidad y consistencia de los agregados del suelo (Hao et al., 2020), se tiene conocimiento que la disponibilidad de nutrientes es un factor importante para las plantas (Sardans et al., 2004), lo que implica que, la presencia de raíces

no formadas completamente o por ausencia de vegetación, dejaría al suelo vulnerable frente a condiciones naturales como precipitaciones que conllevarían a procesos erosivos dando como resultado pérdida de nutrientes (Guimarães et al., 2021), esto provocaría deterioro en la calidad del suelo impidiendo el aprovechamiento de nutrientes (Duan et al., 2019).

El análisis estadístico ANOVA de un factor indica una reducción significativa en la biomasa radicular (figura 22) luego de aplicar los tratamientos con enrofloxacina, las pruebas Post Hoc (prueba HSD de Tukey y prueba de Duncan) (tabla 11) identificaron que la aplicación de las concentraciones de antibiótico se diferencia del grupo testigo. Un caso similar se muestra con la longitud de la raíz que se vio afectada significativamente (figura 23).

### 5.3. Efecto del residuo de enrofloxacina en la cantidad de carbono total en alfalfa

La captación de dióxido de carbono ($CO_2$) por medio de la planta y el proceso de la fotosíntesis, ayuda a que la planta pueda obtener el carbono atmosférico facilitando la obtención de nutrientes naturales para la alfalfa (Erice et al., 2006), esta actividad fotoquímica ayuda a que la planta pueda realizar procesos oxidativos y de reducción para generar energía, por lo que una alteración producida por agentes externos, pudiera impedir estos procesos y generar Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), dando lugar al estrés oxidativo de la planta (Gill et al., 2010). Los datos de las medias demuestran que hubo una reducción significativa en el contenido de carbono en alfalfa (figura 24) luego de haber aplicado enrofloxacina a las muestras en diferentes concentraciones (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$), por lo que, el efecto de antibióticos de amplio espectro pudiera estar propiciando la aparición de ROS lo que provocaría a su vez estrés oxidativo en las células de la planta, deteriorando las membranas e interrumpiendo la actividad fotoquímica (Gomes et al., 2017). Las plantas poseen capacidades

antioxidantes para evitar el exceso de las ROS, sin embargo, los residuos de fluoroquinolonas podrían limitar esta capacidad que posee la planta para protegerse de la sobre oxidación en las células; además, estos residuos de fármacos pudieran estar interviniendo en la síntesis de proteínas de cloroplastos que intervienen en la fotosíntesis y por consiguiente en la captación de carbono (Gomes et al., 2020), ya que estudios previos indican que el deterioro celular afectaría a agentes encargados de realizar dicho proceso (Wall et al., 2004).

Las plantas poseen un sistema de respiración que se favorece por unas aberturas denominadas estomas, que facilitan la captación del $CO_2$; sin embargo, son sensibles a perturbaciones ambientales y como mecanismo de defensa por parte de la planta, las estomas son cerrados trayendo como consecuencia la interrupción en la captación del $CO_2$ (Wang et al., 2019); el análisis estadístico de ANOVA de un factor indica que la reducción en la captación de carbono fue significativa (tabla 16), esta perturbación provocada por el residuo de antibiótico, pudiera contribuir al cierre estomático de alfalfa y por ende reduciría la captación del carbono. Estudios previos muestran que este cierre estomático pudiera deberse a la interferencia en el proceso de la fotosíntesis que es provocado por el estrés que sufren las plantas en condiciones desfavorables (Talbi et al., 2020), estas limitaciones estomáticas reducirían la eficiencia en la fotosíntesis, afectando el intercambio de gases atmosféricos (Athar et al., 2005). La prueba Post Hoc utilizada fue la prueba de Duncan ya que brinda un mejor panorama para identificar los tratamientos que difieren con el testigo, mostrando que los tratamientos DB y DA (2 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) se diferencian del grupo testigo como se aprecia en la tabla 17. El análisis estadístico indica que el efecto de enrofloxacina puede provocar una disminución en la asimilación del carbono que se obtiene de la captación del $CO_2$ (Zivcak et al., 2014) mostrando una disminución de carbono en alfalfa que va de 426.82 ± 5.1 g $Kg^{-1}$

(testigo) a 407.3567 ± 11.0, 412.1850 ± 11.3 y 400.6467 ± 6.8 g $Kg^{-1}$ (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente).

Uno de los principales gases que contribuye al calentamiento global es el $CO_2$, que aporta a que este calentamiento se dé apresuradamente trayendo consecuencias ambientales (Liao et al., 2015); por lo que las plantas juegan un papel en cuanto a la función de amortiguamiento que poseen frente al $CO_2$; con ayuda de microorganismos, la alfalfa se desarrollaría cumpliendo la captación de dicho gas, de manera eficiente y obteniendo el carbono para su beneficio (Erice et al., 2011). Si bien, una mayor disponibilidad del carbono atmosférico favorecería a la planta (Aranjuelo et al., 2006), el aumento del calentamiento ambiental induciría estrés en la vegetación minimizando las funciones que posee y reduciendo su productividad (FAO et al., 2018); estas condiciones pudieran generar estrés oxidativo en la planta, interfiriendo en la fotosíntesis y de tal forma disminuiría la captación de carbono (de la Haba et al., 2014). Estas condiciones presentarían una reducción en la producción vegetativa (Zhao et al., 2016), las consecuencias de la presencia y persistencia del $CO_2$ en la atmósfera y su débil aprovechamiento por parte de la alfalfa, evitaría que la planta brinde el beneficio de amortiguamiento, contribuyendo al calentamiento global que afectaría a zonas vulnerables con inundaciones, deterioro de la calidad del suelo agrícola por perdida de nutrientes que son transportadas por el exceso de precipitaciones (Shukla et al., 2019).

Este estudio sugiere que el residuo de enrofloxacina tendría un efecto a considerar, ya que se evidencia una reducción significativa (Figura 24) del carbono captado por la alfalfa que fue irrigada con antibiótico, esto pudiera aumentar la concentración de carbono gaseoso en la atmósfera.

## 5.4. Efecto del residuo de enrofloxacina en el nitrógeno total acumulado en suelo

La cantidad de nitrógeno contenido, no presentó disminución (figura 26), esto pudiera deberse a que la alfalfa no pudo aprovechar correctamente el nutriente debido a la presencia de enrofloxacina (Anderson et al., 2004), el nitrógeno no fijado quedaría libre en el suelo lo que, pudiera implicar una intervención en el pH (MacKenzie et al., 2020), ya que, estudios previos sugieren que los ambientes que poseen limitada amortiguación de nitrógeno en el suelo son sensibles frente a los cambios en el pH (Clark et al., 2007), por lo que, el aumento en la cantidad de nitrógeno puede reducir el pH en el suelo llegando a volverse un ambiente ácido pudiendo aumentar la mortalidad de las plantas (Phoenix et al., 2012); se debe tomar en cuenta que la alfalfa al captar nitrógeno con ayuda de la bacteria *Rhizobium sp* por medio de los nódulos, a su deceso el nitrógeno contenido quedaría libre para ser aprovechado por otras plantas. Sin embargo, el estudio sugiere que este aumento de la cantidad de nitrógeno en suelo pueda deberse a la interferencia que presenta la enrofloxacina en la formación de nódulos (Pajuelo et al., 2008), esto sugiere que se necesitan realizar más estudios para comprender la fisiología de la planta y el efecto que puede generarse al exponerla a condiciones desfavorables (Kumar et al., 2005).

# VI. CONCLUSIÓN

El presente estudio muestra que una concentración de 2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ de enrofloxacina tiene el efecto de reducir la cantidad de nódulos a 86 ± 20.3, 89.5 ± 37.5 y 44 ± 14.1 unidades respectivamente, comparado con el grupo testigo (520 ± 141.5 unidades), lo que conllevaría una reducción en la captación de nitrógeno para la alfalfa.

La masa radicular de alfalfa se vio reducida de 7.3990 ± 1.2 gramos (testigo) a 2.2357 ± 0.8, 2.8780 ± 1.8 y 1.8697 ± 0.8 gramos, indicando que la presencia de enrofloxacina dificultaría el desarrollo vegetativo promovido por la fitohormona auxina.

La cantidad de carbono captado por la alfalfa que se redujo de 426.82 ± 5.1 g $Kg^{-1}$ (testigo) a 407.3567 ± 11.0, 412.1850 ± 11.3 y 400.6467 ± 6.8 g $Kg^{-1}$ (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) de manera significativa lo que sugiere que el antibiótico puede interferir en el proceso de la fotosíntesis que realiza la alfalfa para captar carbono atmosférico.

El contenido de nitrógeno en suelo no se redujo luego de la aplicación de enrofloxacina ya que la cantidad de nitrógeno contenido en suelo de la muestra testigo fue 1.7900 ± 0.4 g $Kg^{-1}$ y luego de aplicar los tratamientos con antibióticos las concentraciones fueron de 1.9700 ± 0.1, 1.9367 ± 0.3 y 2.0333 ± 0.3 g $Kg^{-1}$ (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente), indicando que las muestras con antibiótico no pudieron aprovechar correctamente el nitrógeno en suelo debido a la disminución en la cantidad de nódulos en raíz.

# VII. RECOMENDACIONES

Para futuros estudios se recomienda realizar un monitoreo de pH en suelo antes y durante el experimento, a fin de poder llevar un control y evitar interrupciones en el crecimiento de la planta, ya que el pH es un factor que puede afectar el proceso de captación de nutrientes.

Se recomienda realizar estudios sobre contaminantes emergentes tanto en suelo como en agua ya que, al no estar incluidos en normativas ambientales nacionales, su regulación es nula además que su presencia en el ambiente trae repercusiones en el deterioro de la calidad del suelo con el pasar del tiempo.

Para tener un panorama más amplio, se recomienda revisar bibliografía actual sobre los efectos de residuos de antibióticos en suelo y su interacción con otros contaminantes, ya que los estudios demuestran que estas interacciones pueden minimizar los procesos como la fotosíntesis en las plantas.

Concientizar sobre el control en la administración de medicamentos veterinarios para minimizar la presencia de residuos de antibióticos en las excretas de los animales de granja y minimizar su concentración en suelo.

## VIII. REFERENCIAS


Aiassa, M. J. (2020). *Ganadería Y Finanzas*. 8.

Aizawa, S.-I. (2014). Sinorhizobium meliloti — Nitrogen–Fixer in the Grassland. *The Flagellar World*, 82–83. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417234-0.00026-8

Albero, B., Tadeo, J. L., Escario, M., Miguel, E., & Pérez, R. A. (2018). Persistence and availability of veterinary antibiotics in soil and soil-manure systems. *Science of the Total Environment*, *643*, 1562–1570. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.314

Anderson, A., Baldock, J. A., Rogers, S. L., Bellotti, W., & Gill, G. (2004). Influence of chlorsulfuron on rhizobial growth, nodule formation, and nitrogen fixation with chickpea. *Australian Journal of Agricultural Research*, *55*(10), 1059–1070. https://doi.org/10.1071/AR03057

Aranjuelo, I., Irigoyen, J. J., Perez, P., Martinez-Carrasco, R., & Sanchez-Diaz, M. (2006). Response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO2: Productivity and water relations. *Environmental and Experimental Botany*, *55*(1–2), 130–141. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.10.007

Athar, H. U. R., & Ashraf, M. (2005). Photosynthesis under drought stress. *Handbook of Photosynthesis, Second Edition*, *January 2005*, 893–809. https://doi.org/10.1201/9781420027877

Attili, A. R., Preziuso, S., Ngwa, V. N., Cantalamessa, A., Moriconi, M., & Cuteri, V. (2016). Clinical evaluation of the use of enrofloxacin against Staphylococcus aureus clinical mastitis in sheep. *Small Ruminant Research*, *136*, 72–77. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.004

Basigalup D. y Rossanigo R. (2007). Panorama actual de la alfalfa en la Argentina. *El Cultivo de La Alfalfa En La Argentina. Ediciones INTA*, 15.

Bernal, G., Suarez, A., Perez, M., & Campana, D. (2002). Inoculación de la semilla de leguminosas con la bacteria\Rhizobium 401 Quito (Ecuador). No. 195.

Boland, M. J., Rae, A. N., Vereijken, J. M., Meuwissen, M. P. M., Fischer, A. R. H., van Boekel, M. A. J. S., Rutherfurd, S. M., Gruppen, H., Moughan, P. J., & Hendriks, W. H. (2013). The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends in Food Science and Technology*, *29*(1), 62–73. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.07.002

Bücker-Neto, L., Paiva, A. L. S., Machado, R. D., Arenhart, R. A., & Margis-Pinheiro, M. (2017). Interactions between plant hormones and heavy metals responses. *Genetics and Molecular Biology*, *40*(1), 373–386. https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0087

Buta, M., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Hubeny, J., Zieliński, W., Rolbiecki, D., Bajkacz, S., Felis, E., & Kokoszka, K. (2021). Microbial and chemical pollutants on the manure-crops pathway in the perspective of "One Health" holistic approach. *Science of the Total Environment*, *785*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147411

Carrasco, J. A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M. A., López, R., Chamber, M. A., & Palomares, A. J. (2005). Isolation and characterisation of symbiotically effective Rhizobium resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry*, *37*(6), 1131–1140. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.11.015

Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025

Chen, H., Rhoades, C. C., & Chow, A. T. (2020). Characteristics of soil organic matter 14 years after a wildfire: A pyrolysis-gas-chromatography mass spectrometry (Py-GC-MS) study. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *152*(September), 104922. https://doi.org/10.1016/j.jaap.2020.104922

Cho, M., & Kim, K. (2021). Diclofenac modified the root system architecture of Arabidopsis via interfering with the hormonal activities of auxin. *Journal of Hazardous Materials*, *413*(August 2020), 125402. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125402

Chung, H. S., Lee, Y. J., Rahman, M. M., Abd El-Aty, A. M., Lee, H. S., Kabir, M. H., Kim, S. W., Park, B. J., Kim, J. E., Hacımüftüoğlu, F., Nahar, N., Shin, H. C., & Shim, J. H. (2017). Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish. *Science of the Total Environment*, *605–606*, 322–331. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.231

Clark, C. M., Cleland, E. E., Collins, S. L., Fargione, J. E., Gough, L., Gross, K. L., Pennings, S. C., Suding, K. N., & Grace, J. B. (2007). Environmental and plant community determinants of species loss following nitrogen enrichment. *Ecology Letters*, *10*(7), 596–607. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01053.x

Czarnocka, W., & Karpiński, S. (2018). Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, *122*(January), 4–20. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011

de la Haba, P., de la Mata, L., Molina, E., & Agüera, E. (2014). High temperature promotes early senescence in primary leaves of sunflower (Helianthus annuus L.) plants. *Canadian Journal of Plant Science*, *94*(4), 659–669. https://doi.org/10.4141/CJPS2013-276

Duan, C., Razavi, B. S., Shen, G., Cui, Y., Ju, W., Li, S., & Fang, L. (2019). Deciphering the rhizobium inoculation effect on spatial distribution of phosphatase activity in the rhizosphere of alfalfa under copper stress. *Soil Biology and Biochemistry*, *137*(May), 107574. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107574

Duchene, O., Vian, J. F., & Celette, F. (2017). Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *240*, 148–161. https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.02.019

Environmental, C., Act, P., Act, H. P., Act, D., Control, P., Act, P., Environmental, C., Act, P., Act, F., Environmental, C., & Act, P. (2009). *Sustancias químicas y el medio ambiente*.

Erice, G., Irigoyen, J. J., Pérez, P., Martínez-Carrasco, R., & Sánchez-Díaz, M. (2006). Effect of elevated CO2, temperature and drought on dry matter partitioning and photosynthesis before and after cutting of nodulated alfalfa. *Plant Science*, *170*(6), 1059–1067. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.018

Erice, G., Sanz-Sáez, A., Aranjuelo, I., Irigoyen, J. J., Aguirreolea, J., Avice, J. C., & Sánchez-Díaz, M. (2011). Photosynthesis, N2 fixation and taproot reserves during the cutting regrowth cycle of alfalfa under elevated CO2 and temperature. *Journal of Plant Physiology*, *168*(17), 2007–2014. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.07.007

Fan, J. W., Du, Y. L., Wang, B. R., Turner, N. C., Wang, T., Abbott, L. K., Stefanova, K., Siddique, K. H. M., & Li, F. M. (2016). Forage yield, soil water depletion, shoot nitrogen and phosphorus uptake and concentration, of young and old stands of alfalfa in response to nitrogen and phosphorus fertilisation in a semiarid environment. *Field Crops Research*, *198*, 247–257. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.08.014

FAO. (2017). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Aprovechar los sitemas alimentarios para lograr una transformación rural inclusiva*. https://doi.org/0251-1371

FAO. (2018). *The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050*. http://www.fao.org/3/I8429EN/i8429en.pdf

Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52*(1), 61–76. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x

Gao, Y., Lu, C., Shen, D., Liu, J., Ma, Z., Yang, B., Ling, W., & Waigi, M. G. (2019). Elimination of the risks of colistin resistance gene (mcr-1) in livestock manure during composting. *Environment International*, *126*(November 2018), 61–68. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.015

García, F. (1995). Recientes avances sobre los mecanismos de acción de exotoxinas bacterianas que actúan intracelularmente. *Rev. Costarric. Cienc. Méd*, *16*(3), 85–95.

García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Ct*, *3*, 173–186.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909–930. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016

Gomes, M. P., Gonçalves, C. A., de Brito, J. C. M., Souza, A. M., da Silva Cruz, F. V., Bicalho, E. M., Figueredo, C. C., & Garcia, Q. S. (2017). Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (Lemna minor L.): Implications for energy metabolism and antibiotic-uptake ability. *Journal of Hazardous Materials*, *328*, 140–149. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.01.005

Gomes, M. P., Moreira Brito, J. C., Cristina Rocha, D., Navarro-Silva, M. A., & Juneau, P. (2020). Individual and combined effects of amoxicillin, enrofloxacin, and oxytetracycline on Lemna minor physiology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *203*(July). https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111025

Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, *131*(3), 872–877. https://doi.org/10.1104/pp.017004

Grenni, P., Ancona, V., & Barra Caracciolo, A. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, *136*, 25–39. https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006

GTIS, & FAO. (2019). La Contaminación Del Suelo: Una Realidad Oculta. In *Organizacion de las Naciones Unidas para la alimentacion y la agricultura FAO*. http://www.fao.org/3/I9183ES/i9183es.pdf

Guimarães, D. V., Silva, M. L. N., Beniaich, A., Pio, R., Gonzaga, M. I. S., Avanzi, J. C., Bispo, D. F. A., & Curi, N. (2021). Dynamics and losses of soil organic matter and nutrients by water erosion in cover crop management systems in olive groves, in tropical regions. *Soil and Tillage Research*, *209*(February). https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104863

Hao, H., Cheng, L., Guo, Z., Wang, L., & Shi, Z. (2020). Plant community characteristics and functional traits as drivers of soil erodibility mitigation along a land degradation gradient. *Land Degradation and Development*, *31*(14), 1851–1863. https://doi.org/10.1002/ldr.3579

Harms, A., Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*, *354*(6318). https://doi.org/10.1126/science.aaf4268

Hernandez, Gonzalo. M. Camejo. H. P. (2011). *Manual De Metodos Logico-Cuantitativos*. http://www.cse.edu.uy/sites/www.cse.edu.uy/files/documentos/Liccom_Camejo_2011-07-28.pdf

Huang, L., Riggins, C. W., Rodríguez-Zas, S., Zabaloy, M. C., & Villamil, M. B. (2019). Long-term N fertilization imbalances potential N acquisition and transformations by soil microbes. *Science of the Total Environment*, *691*, 562–571. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.154

Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., & Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, *22*(9), 536–545. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005

Ju, W., Liu, L., Fang, L., Cui, Y., Duan, C., & Wu, H. (2019). Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *167*(September 2018), 218–226. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.016

Koba, O., Golovko, O., Kodešová, R., Fér, M., & Grabic, R. (2017). Antibiotics degradation in soil: A case of clindamycin, trimethoprim, sulfamethoxazole and their transformation products. *Environmental Pollution*, *220*, 1251–1263. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.007

Kong, W. D., Zhu, Y. G., Liang, Y. C., Zhang, J., Smith, F. A., & Yang, M. (2007). *Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (Medicago sativa L.)*. *147*, 187–193. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.016

Kong, W., Li, C., Dolhi, J. M., Li, S., He, J., & Qiao, M. (2012). Characteristics of oxytetracycline sorption and potential bioavailability in soils with various physical-chemical properties. *Chemosphere*, *87*(5), 542–548. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.062

Kumar, K., Gupta, S. C., Baidoo, S. K., Chander, Y., & Rosen, C. J. (2005). Antibiotic Uptake by Plants from Soil Fertilized with Animal Manure. *Journal of Environmental Quality*, *34*(6), 2082–2085. https://doi.org/10.2134/jeq2005.0026

Leavey-Roback, S. L., Krasner, S. W., & Suffet, I. M. H. (2016). Veterinary antibiotics used in animal agriculture as NDMA precursors. *Chemosphere*, *164*, 330–338. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.070

Lee, M. A. (2018). A global comparison of the nutritive values of forage plants grown in contrasting environments. *Journal of Plant Research*, *131*(4), 641–654. https://doi.org/10.1007/s10265-018-1024-y

Li, T., Zhou, Z., Zhang, K., Ma, W., Chen, W., Tu, P., Li, J., Song, Q., & Song, Y. (2021). Direct infusion–tandem mass spectrometry combining with data mining strategies enables rapid chemome characterization of medicinal plants: A case study of

Polygala tenuifolia. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *204*, 114281. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114281

Li, Y., Tang, H., Hu, Y., Wang, X., Ai, X., Tang, L., Matthew, C., Cavanagh, J., & Qiu, J. (2016). Enrofloxacin at environmentally relevant concentrations enhances uptake and toxicity of cadmium in the earthworm Eisenia fetida in farm soils. *Journal of Hazardous Materials*, *308*, 312–320. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.057

Liao, P. Q., Chen, H., Zhou, D. D., Liu, S. Y., He, C. T., Rui, Z., Ji, H., Zhang, J. P., & Chen, X. M. (2015). Monodentate hydroxide as a super strong yet reversible active site for CO2 capture from high-humidity flue gas. *Energy and Environmental Science*, *8*(3), 1011–1016. https://doi.org/10.1039/c4ee02717e

Liu, C., Yao, H., Chapman, S. J., Su, J., & Wang, C. (2020). Changes in gut bacterial communities and the incidence of antibiotic resistance genes during degradation of antibiotics by black soldier fly larvae. *Environment International*, *142*(March), 105834. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105834

Lu, X. M., Lu, P. Z., & Yang, K. (2017). Restoration using Azolla imbricata increases nitrogen functional bacterial groups and genes in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(9), 3849–3859. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8108-9

MacKenzie, M. D., & Dietrich, S. T. (2020). Atmospheric sulfur and nitrogen deposition in the Athabasca oil sands region is correlated with foliar nutrient levels and soil chemical properties. *Science of the Total Environment*, *711*, 134737. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134737

MAGA. (2015). El Agro en cifras. *Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Alimentación*, 63. https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/Integracion y comercio exterior/el_agro_en_cifras_2015.pdf

Memor, E., Nacional, S., Agraria, S., Supremo, D., Agropecuarios, I., Agroalimentaria, I., Agropecuarios, I., Agroalimentaria, I., Pecuarios, I., Veterinario, U., Supremo, D., Supremo, D., Institucional, P., Pecuarios, I., Agropecuarios, I., & Agroalimentaria, I. (2012). *Resolución Directoral*.

Mendes, K. F., de Sousa, R. N., Takeshita, V., Alonso, F. G., Régo, A. P. J., & Tornisielo, V. L. (2019). Cow bone char as a sorbent to increase sorption and decrease mobility of hexazinone, metribuzin, and quinclorac in soil. *Geoderma*, *343*(June 2018), 40–49. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.02.009

Montanarella, L., Pennock, D., & Mckenzie, N. (2016). Estado mundial del recurso del suelo (EMRS) - Resumen Tecnico. In *Fao*. http://www.fao.org/3/a-i5126s.pdf

Moreira, J. C. F., Brum, M., de Almeida, L. C., Barrera-Berdugo, S., de Souza, A. A., de Camargo, P. B., Oliveira, R. S., Alves, L. F., Rosado, B. H. P., & Lambais, M. R. (2021). Asymbiotic nitrogen fixation in the phyllosphere of the Amazon forest: Changing

nitrogen cycle paradigms. *Science of the Total Environment*, *773*(February), 145066. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145066

Moreno, M., Peña, M., & Alvarez, R. (2017). Implementación del Método para la Determinación de Isótopos Estables de Carbono (δ13C) en Carbones Mediante Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas (IRMS). *Revista Investigaciones y Aplicaciones Nucleares*, 50–59. https://doi.org/10.32685/2590-7468/invapnuclear.1.2017.47

Moshiri, F., Ebrahimi, H., Reza, M., & Rejali, F. (2019). Ecotoxicology and Environmental Safety Biogeochemical distribution of Pb and Zn forms in two calcareous soils a ff ected by mycorrhizal symbiosis and alfalfa rhizosphere. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *179*(November 2018), 241–248. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.055

Norlin, E., Irgum, K., & Anders Ohlsson, K. E. (2007). Nitrogen isotope analysis of free glycine in soil using isotope dilution mass spectrometry. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*(2), 550–559. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.09.001

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1996). *Ecología y enseñanza rural : nociones ambientales básicas para profesores rurales y extensionistas.*

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2017). *Respuesta mundial para el control de vectores – enfoque integrado para el control de las enfermedades de transmisión vectorial*. *2030*, 4. http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf

Otero, J. L., Mestorino, N., & Errecalde, J. O. (2001). Enrofloxacina : Una Fluorquinolona De Uso Exclusivo En Veterinaria Parte I : Química , Mecanismo De Acción , Actividad Antimicrobiana Y Resistencia Bacteriana. *Analecta Veterinaria*, *2805*(3080), 31–41. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11128/Documento_completo__.pdf?sequence=1

Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I. D., Dary, M., & Palomares, A. J. (2008). Toxic effects of arsenic on Sinorhizobium-Medicago sativa symbiotic interaction. *Environmental Pollution*, *154*(2), 203–211. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.10.015

Pan, M., & Chu, L. M. (2017). Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Science of the Total Environment*, *599–600*, 500–512. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.214

Papich, M. G. (2021). Enrofloxacin. *Papich Handbook of Veterinary Drugs*, 325–328. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-70957-6.00192-8

Pascual Anderson, Ma. del R., & Calderón y Pascual, V. (2014). *Microbiología alimentarios: Metodología analítica para alimentos y bebidas*.

Phoenix, G. K., Emmett, B. A., Britton, A. J., Caporn, S. J. M., Dise, N. B., Helliwell, R., Jones, L., Leake, J. R., Leith, I. D., Sheppard, L. J., Sowerby, A., Pilkington, M. G., Rowe, E. C., Ashmore, M. R., & Power, S. A. (2012). Impacts of atmospheric nitrogen deposition: Responses of multiple plant and soil parameters across contrasting ecosystems in long-term field experiments. *Global Change Biology*, *18*(4), 1197–1215. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02590.x

Pourbabaee, A. A., Khazaei, M., Alikhani, H. A., & Emami, S. (2021). Root nodulation of alfalfa by Ensifer meliloti in petroleum contaminated soil. *Rhizosphere*, *17*(November 2020), 100305. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100305

Riaz, L., Mahmood, T., Yang, Q., Coyne, M. S., & D'Angelo, E. (2019). Bacteria-assisted removal of fluoroquinolones from wheat rhizospheres in an agricultural soil. *Chemosphere*, *226*, 8–16. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.081

Sardans, J., & Peñuelas, J. (2004). Increasing drought decreases phosphorus availability in an evergreen Mediterranean forest. *Plant and Soil*, *267*(1–2), 367–377. https://doi.org/10.1007/s11104-005-0172-8

Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, *65*(5), 725–759. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026

Schierstaedt, J., Jechalke, S., Nesme, J., Neuhaus, K., Sørensen, S. J., Grosch, R., Smalla, K., & Schikora, A. (2020). Salmonella persistence in soil depends on reciprocal interactions with indigenous microorganisms. *Environmental Microbiology*, *22*(7), 2639–2652. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14972

Seo, Y.-H., Cho, B.-O., Kang, A.-S., Jeong, B.-C., & Jung, Y.-S. (2010). Antibiotic Uptake by Plants from Soil Applied with Antibiotic-Treated Animal Manure. *Korean J. Soil Sci. Fert*, *43*(4), 466–470. https://pdfs.semanticscholar.org/8570/ae4b8a4c897fe74fa678df806c4ab314b815.pdf

Shan, J., Yang, P., Rahman, M. M., Shang, X., & Yan, X. (2018). Tetracycline and sulfamethazine alter dissimilatory nitrate reduction processes and increase N2O release in rice fields. *Environmental Pollution*, *242*, 788–796. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.061

Shen, D., Lu, Z., Zhong, J., Zhang, S., Ye, Q., Wang, W., & Gan, J. (2021). Combination of high specific activity carbon-14 labeling and high resolution mass spectrometry to study pesticide metabolism in crops: Metabolism of cycloxaprid in rice. *Environment International*, *157*(September), 106879. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106879

Shukla, P. R., Skea, J., Slade, R., Diemen, R. van, Haughey, E., Malley, J., M. Pathak, & Pereira, J. P. (2019). Foreword Technical and Preface. *Climate Change and Land:*

*An IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse Gas Fluxes in Terrestrial Ecosystems*, 35–74.

Soto, C., González, E., Gutiérrez, S., & Leon, A. (2010). Biotransformation of heavy metals present in riverside sludge from the Bogotá and Tunjuelo rivers. *Nova*, *8*(14), 195.

Sun, J., Zeng, Q., Tsang, D. C. W., Zhu, L. Z., & Li, X. D. (2017). Antibiotics in the agricultural soils from the Yangtze River Delta, China. *Chemosphere*, *189*, 301–308. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.040

Talbi, S., Rojas, J. A., Sahrawy, M., Rodríguez-Serrano, M., Cárdenas, K. E., Debouba, M., & Sandalio, L. M. (2020). Effect of drought on growth, photosynthesis and total antioxidant capacity of the saharan plant Oudeneya africana. *Environmental and Experimental Botany*, *176*(January), 104099. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104099

Tasho, R. P., & Cho, J. Y. (2016). Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Science of the Total Environment*, *563–564*(3), 366–376. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.140

Tazi, A., & Bricaire, F. (2007). Elección de un antibiótico. *EMC - Tratado de Medicina*, *11*(3), 1–5. https://doi.org/10.1016/s1636-5410(07)70630-x

Uddin, M., Chen, J., Qiao, X., Tian, R., Arafat, Y., & Yang, X. (2019). Bacterial community variations in paddy soils induced by application of veterinary antibiotics in plant-soil systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *167*(July 2018), 44–53. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.101

van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(18), 5649–5654. https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112

Wall, M. K., Mitchena, L. A., & Maxwell, A. (2004). Arabidopsis thaliana DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(20), 7821–7826. https://doi.org/10.1073/pnas.0400836101

Wang, X., Fernandes de Souza, M., Li, H., Tack, F. M. G., Ok, Y. S., & Meers, E. (2021). Zn phytoextraction and recycling of alfalfa biomass as potential Zn-biofortified feed crop. *Science of the Total Environment*, *760*, 143424. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143424

Wang, X. M., Wang, X. K., Su, Y. B., & Zhang, H. X. (2019). Land pavement depresses photosynthesis in urban trees especially under drought stress. *Science of the Total Environment*, *653*, 120–130. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.281

Xu, H., Chen, Z., Wu, X., Zhao, L., Wang, N., Mao, D., Ren, H., & Luo, Y. (2021). Antibiotic contamination amplifies the impact of foreign antibiotic-resistant bacteria on soil bacterial community. *Science of the Total Environment*, *758*, 143693. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143693

Yang, L., Wen, Q., Zhao, Y., Chen, Z., Wang, Q., & Bürgmann, H. (2019). New insight into effect of antibiotics concentration and process configuration on the removal of antibiotics and relevant antibiotic resistance genes. *Journal of Hazardous Materials*, *373*(December 2018), 60–66. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.060

Zhang, J., Wang, Q., Pang, X. P., Xu, H. P., Wang, J., Zhang, W. N., & Guo, Z. G. (2021). Effect of partial root-zone drying irrigation (PRDI) on the biomass, water productivity and carbon, nitrogen and phosphorus allocations in different organs of alfalfa. *Agricultural Water Management*, *243*(December 2019), 106525. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106525

Zhang, W., Naveena, B. M., Jo, C., Sakata, R., Zhou, G., Banerjee, R., & Nishiumi, T. (2017). Technological demands of meat processing–An Asian perspective. *Meat Science*, *132*, 35–44. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.05.008

Zhao, C., Piao, S., Wang, X., Huang, Y., Ciais, P., Elliott, J., Huang, M., Janssens, I. A., Li, T., Lian, X., Liu, Y., Müller, C., Peng, S., Wang, T., Zeng, Z., & Peñuelas, J. (2016). Plausible rice yield losses under future climate warming. *Nature Plants*, *3*(December), 1–5. https://doi.org/10.1038/nplants.2016.202

Zhou, J., Jiang, X., Zhou, B., Zhao, B., Ma, M., Guan, D., Li, J., Chen, S., Cao, F., Shen, D., & Qin, J. (2016). Thirty four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, *95*, 135–143. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.12.012

Zhou, X., Wang, J., Lu, C., Liao, Q., Gudda, F. O., & Ling, W. (2020). Antibiotics in animal manure and manure-based fertilizers: Occurrence and ecological risk assessment. *Chemosphere*, *255*, 127006. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127006

Zivcak, M., Kalaji, H. M., Shao, H. B., Olsovska, K., & Brestic, M. (2014). Photosynthetic proton and electron transport in wheat leaves under prolonged moderate drought stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *137*, 107–115. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.007

# ANEXOS

# ANEXO 1: PROCEDIMIENTO EN LABORATORIO




*Figura 27: Alfalfa en crecimiento (fuente propia)*



*Figura 28: Tratamiento – alfalfa (fuente propia)*

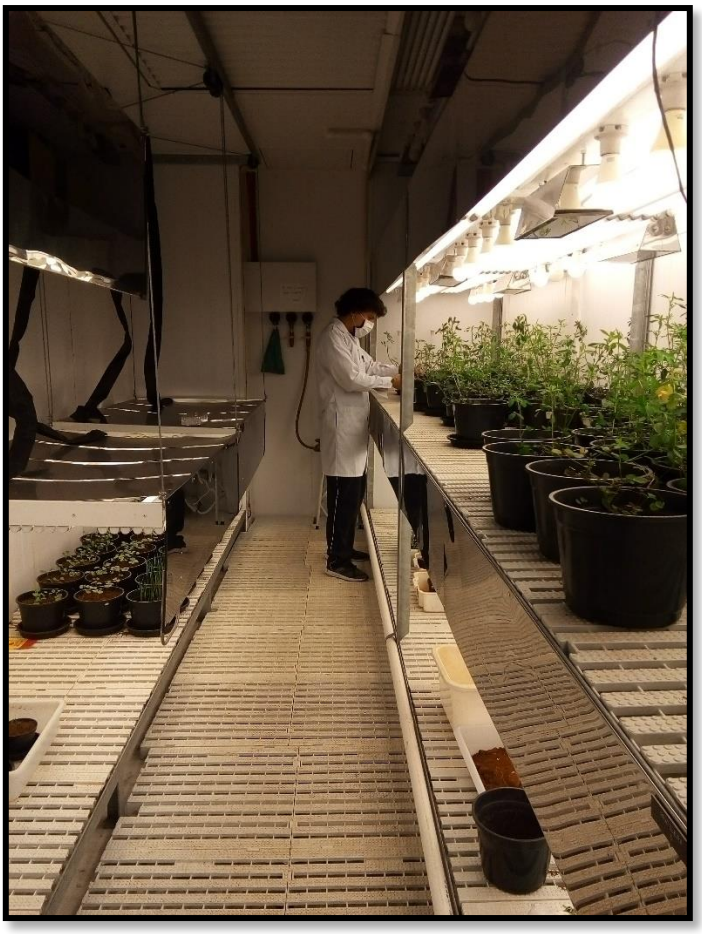


*Figura 29: Selección de muestras para análisis (fuente propia)*



*Figura 30: Procedimiento para retirar la muestra de la maseta (fuente propia)*



*Figura 31: Procedimiento para retirar la muestra de la maceta (fuente propia)*



*Figura 32: Procedimiento para limpieza de raíces (fuente propia)*



*Figura 33: Limpieza de raíces - nódulos en raíz (fuente propia)*



*Figura 34: Medición de parte aérea y raíz de alfalfa (fuente propia)*



*Figura 35: Limpieza de raíces para conteo de nódulos (fuente propia)*



*Figura 36: Conteo de nódulos en raíz (fuente propia)*



*Figura 37: Conteo de nódulos (fuente propia)*




*Figura 38: Corte y pesado de tallo y hojas de alfalfa (fuente propia)*



*Figura 39: Control del peso de raíz de alfalfa (fuente propia)*



*Figura 40: Muestras en estufa para evaporar humedad (fuente propia)*




*Figura 41: Cernido de tierra agrícola (fuente propia)*

# ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

*Tabla 22: Resultados de mediciones (fuente propia)*

| VARIABLES | TESTIGO | TRATAMIENTOS CON ENR (µg $L^{-1}$) | | | PROMEDIO |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 | 20 | 200 | |
| Nódulos de raíz (unidad) | 520 ± 141.5 | 86 ± 20.3 | 89.5 ± 37.5 | 44 ± 14.1 | 208.5 ± 226.3 |
| Masa aérea (gr) fresco | 7.7140 ± 4.3 | 5.4347 ± 0.6 | 5.8983 ± 3.0 | 4.8017 ± 1.3 | 5.9622 ± 2.6 |
| Masa radicular fresco (gr) | 7.3990 ± 1.2 | 2.2357 ± 0.8 | 2.8780 ± 1.8 | 1.8697 ± 0.8 | 3.2498 ± 2.3 |
| Longitud de raíz (cm) | 40,5000 ± 9,1 | 26,0000 ± 2,0 | 23,3333 ± 0,6 | 24,0000 ± 1,8 | 27,3636 ± 7,3 |
| Carbono tallos y hojas (g $Kg^{-1}$) | 426.82 ± 5.1 | 407.3567 ± 11.0 | 412.1850 ± 11.3 | 400.6467 ± 6.8 | 411.7127 ± 12.7 |
| Carbono raíz (g $Kg^{-1}$) | 272.97 ± 42.0 | 221.6633 ± 28.3 | 219.67 ± 60.5 | 201.8733 ± 45.6 | 229.0442 ± 47.7 |
| Nitrógeno suelo (g $kg^{-1}$) | 1.7900 ± 0.4 | 1.9700 ± 0.1 | 1.9367 ± 0.3 | 2.0333 ± 0.3 | 1.9325 ± 0.2 |

## Cantidad de nódulos en raíz

*Tabla 23: Anexo - resultados en nódulos de raíz (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 520,0000 | 141,53445 | 81,71495 | 168,4089 | 871,5911 | 392,00 | 672,00 |
| DB (2µg/L) | 3 | 86,0000 | 20,29778 | 11,71893 | 35,5775 | 136,4225 | 64,00 | 104,00 |
| DM (20 µg/L) | 2 | 89,5000 | 37,47666 | 26,50000 | -247,2144 | 426,2144 | 63,00 | 116,00 |
| DA (200 µg/L) | 2 | 44,0000 | 14,14214 | 10,00000 | -83,0620 | 171,0620 | 34,00 | 54,00 |
| Total | 10 | 208,5000 | 226,33567 | 71,57362 | 46,5892 | 370,4108 | 34,00 | 672,00 |

Supuesto 01: Prueba de normalidad – la distribución de los residuales debe ser normal

*Tabla 24: Anexo - pruebas de normalidad – nódulos en raíz (fuente propia)*

| | | **Pruebas de normalidad** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | Kolmogorov-Smirnov[a] | | | Shapiro-Wilk | | |
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Nódulos en raíz | Testigo | 0,234 | 3 | . | 0,978 | 3 | 0,719 |
| | DB (2 µg/L) | 0,245 | 3 | . | 0,971 | 3 | 0,672 |
| | DM (20 µg/L) | 0,260 | 2 | . | - | | - |
| | DA (200 µg/L) | 0,260 | 2 | . | - | | - |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Planteamiento de hipótesis:

Ho: los datos siguen una distribución normal

H1: los datos siguen una distribución diferente a la normal

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Shapiro-Wilk (se utiliza esta prueba debido a que la cantidad de datos son menores a 30 datos)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que los valores de significancia de la prueba estadística de Shapiro-Wilk 0.719, 0.672 son mayores a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que los datos siguen una distribución normal.

Nota: la prueba de normalidad indica que, si los datos siguen una distribución normal, se podrá utilizar una prueba estadística paramétrica como el Análisis de Varianza (ANOVA).

Supuesto 02: Homocedasticidad que consiste en la homogeneidad de las varianzas

*Tabla 25: Anexo - prueba de homogeneidad de varianza - nódulos en raíz (fuente propia)*

| **Prueba de homogeneidad de varianzas** | | | |
|---|---|---|---|
| Nódulos en raíz | | | |
| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
| 3,249 | 3 | 6 | 0,102 |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre las varianzas

H1: si existe diferencia entre las varianzas

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Levene

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Levene 0.102 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre las varianzas.

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 26: Anexo - ANOVA - nódulos en raíz (fuente propia)*

| **ANOVA de un factor** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Nódulos en raíz | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 418558,000 | 3 | 139519,333 | 19,700 | 0,002 |
| Intra-grupos | 42492,500 | 6 | 7082,083 | | |
| Total | 461050,500 | 9 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.002 es menor a 0.05, entonces se rechaza la Ho y se concluye que al menos uno de los tratamientos es diferente.

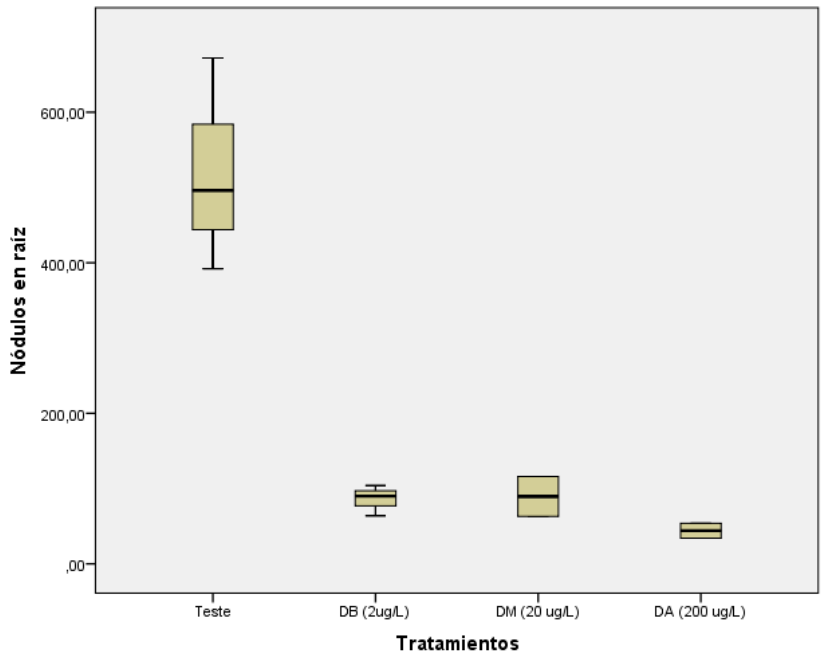



*Figura 42: Anexo - resultados de cantidad de nódulos en raíz (fuente propia)*

La figura 42 muestra una diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, sin embargo, se realizó una prueba posterior (Post Hoc) para verificar el contraste de las medias y

determinar que grupo de tratamiento se diferencia significativamente del grupo testigo.

**PRUEBAS DE POST HOC**

Para grupos homogéneos

*Tabla 27: Anexo - prueba post hoc - nódulos en raíz (fuente propia)*

| | **Nódulos en raíz** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | N | Subconjunto para-alfa = 0.05 | |
| | | | 1 | 2 |
| HSD de Tukey[a,b] | DA (200 µg/L) | 2 | 44,0000 | |
| | DB (2 µg/L) | 3 | 86,0000 | |
| | DM (20 µg/L) | 2 | 89,5000 | |
| | Testigo | 3 | | 520,0000 |
| | Sig. | | 0,931 | 1,000 |
| Duncan[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 44,0000 | |
| | DB (2µg/L) | 3 | 86,0000 | |
| | DM (20 µg/L) | 2 | 89,5000 | |
| | Testigo | 3 | | 520,0000 |
| | Sig. | | 0,587 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,400.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Dado que existe al menos un tratamiento diferente al testigo, se aplicó la prueba Post Hoc para verificar que grupo de tratamiento es diferente, para ello se utilizó la prueba HSD de Tukey y la prueba de Duncan para comparar sus resultados de agrupación y verificar que subconjunto se adapta mejor a la figura 42.

- La prueba HSD de Tukey agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.

- La prueba Duncan agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.

Ambas pruebas indican que los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) se diferencian del grupo testigo. Cabe resaltar que la prueba de HSD de Tukey y la prueba de Duncan se utilizaron para brindar un mejor panorama y de tal forma, poder determinar que tratamiento se diferencia del testigo.

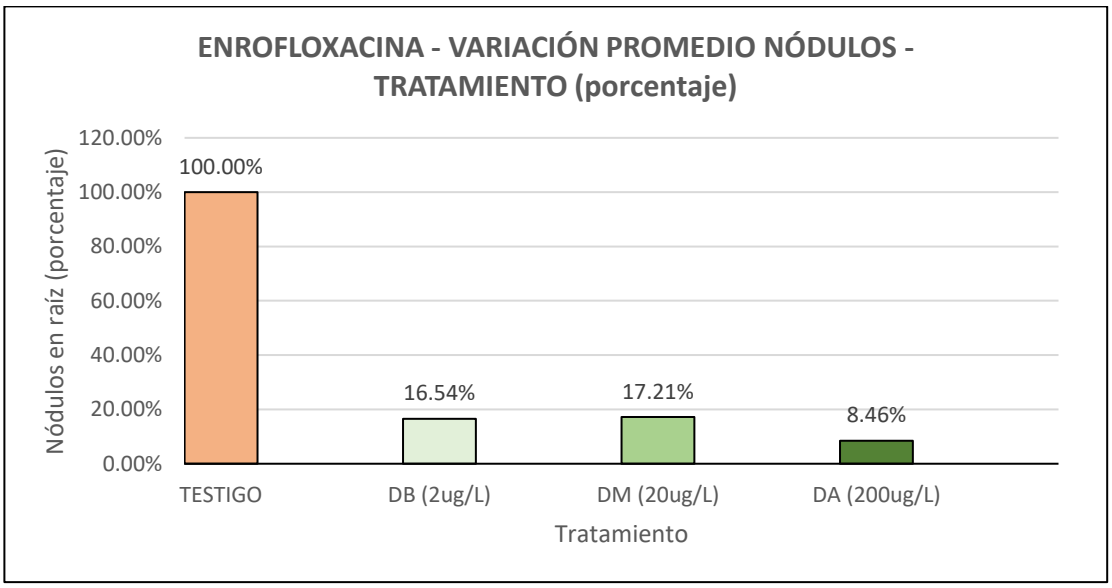



*Gráfico 1: Cantidad de nódulos (fuente propia)*

La aplicación de enrofloxacina en suelo y alfalfa, provocó una reducción de 85,93 % en la cantidad de nódulos formados en la raíz de alfalfa.

## Masa aérea y radicular en condición fresco

### Masa aérea

*Tabla 28: Anexo - resultados en masa aérea (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 7,7140 | 4,29230 | 2,47816 | -2,9487 | 18,3767 | 3,09 | 11,57 |
| DB (2 µg/L) | 3 | 5,4347 | 0,63558 | 0,36695 | 3,8558 | 7,0135 | 4,81 | 6,08 |
| DM (20 µg/L) | 3 | 5,8983 | 2,99218 | 1,72754 | -1,5347 | 13,3313 | 2,60 | 8,43 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 4,8017 | 1,34585 | 0,77703 | 1,4584 | 8,1449 | 3,70 | 6,30 |
| Total | 12 | 5,9622 | 2,58102 | 0,74508 | 4,3223 | 7,6021 | 2,60 | 11,57 |

Supuesto 01: Prueba de normalidad – la distribución de los residuales debe ser normal.

*Tabla 29: Anexo - prueba de normalidad - masa aérea (fuente propia)*

| | | **Pruebas de normalidad** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | Kolmogorov-Smirnov[a] | | | Shapiro-Wilk | | |
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Fresco - Masa Aérea(gr) | Testigo | 0,237 | 3 | . | 0,976 | 3 | 0,704 |
| | DB (2 µg/L) | 0,177 | 3 | . | 1,000 | 3 | 0,970 |
| | DM (20 µg/L) | 0,269 | 3 | . | 0,950 | 3 | 0,568 |
| | DA (200 µg/L) | 0,282 | 3 | . | 0,935 | 3 | 0,508 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Planteamiento de hipótesis:

Ho: los datos siguen una distribución normal

H1: los datos siguen una distribución diferente a la normal

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Shapiro-Wilk (se utiliza esta prueba debido a que la cantidad de datos son menores a 30 datos)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que los valores de significancia de la prueba estadística de Shapiro-Wilk 0.704, 0.970, 0.568, 0.508 son mayores a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que los datos siguen una distribución normal.

Nota: la prueba de normalidad indica que, si los datos siguen una distribución normal, se podrá utilizar una prueba estadística paramétrica como el Análisis de Varianza (ANOVA).

Supuesto 02: Homocedasticidad que consiste en la homogeneidad de las varianzas

*Tabla 30: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - masa aérea (fuente propia)*

| **Prueba de homogeneidad de varianzas** | | | |
|---|---|---|---|
| Fresco - Masa Aérea (gr) | | | |
| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
| 2,713 | 3 | 8 | 0,115 |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre las varianzas

H1: si existe diferencia entre las varianzas

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Levene

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Levene 0.115 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre las varianzas.

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 31: Anexo - ANOVA - masa aérea (fuente propia)*

| ANOVA de un factor | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Fresco - Masa Aérea(gr) | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 14,094 | 3 | 4,698 | 0,635 | 0,613 |
| Intra-grupos | 59,185 | 8 | 7,398 | | |
| Total | 73,279 | 11 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.613 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre los tratamientos.

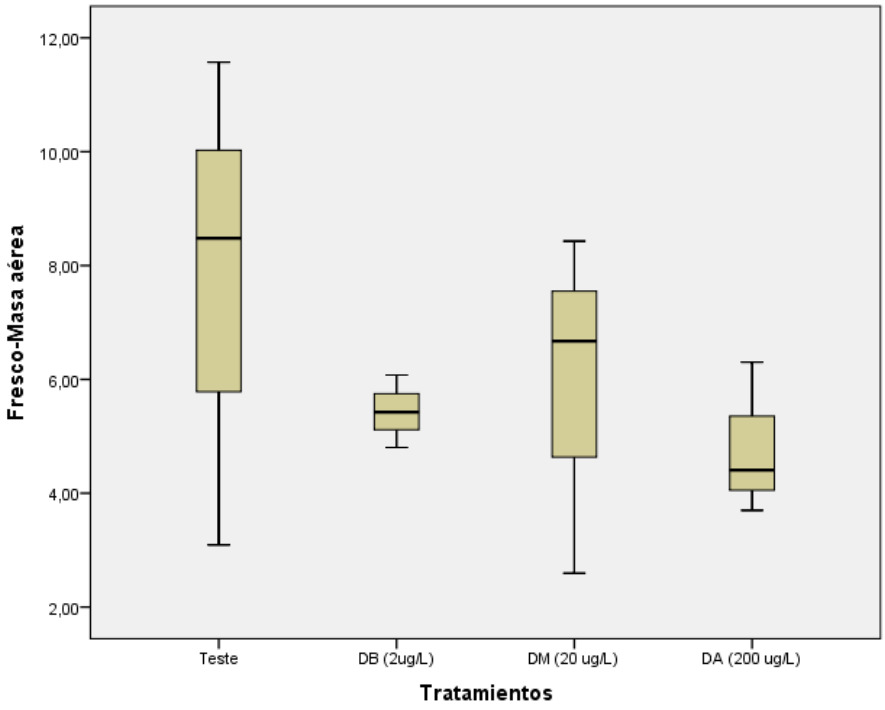



*Figura 43: Anexo - resultados de masa aérea (fuente propia)*

La figura 43 muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, ya que los valores de las medias se encuentran dentro de los rangos mínimos y máximos de la barra testigo que se muestra en el gráfico, esto indica que no se requiere realizar una prueba posterior (Post Hoc).

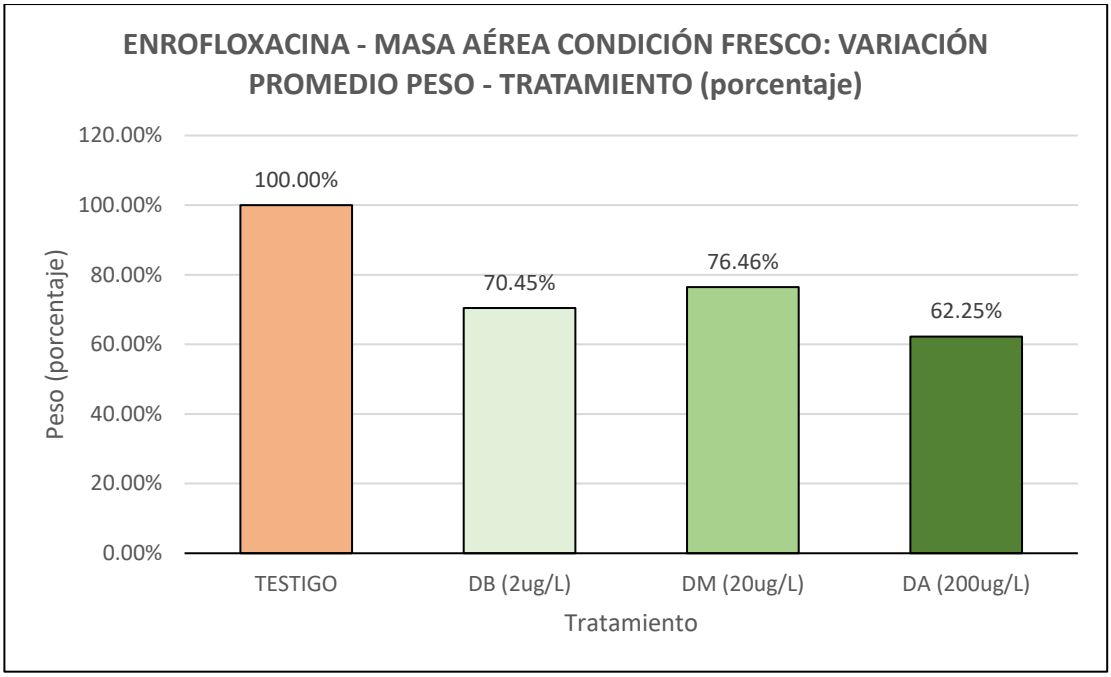



*Gráfico 2: Masa aérea (fuente propia)*

La aplicación de enrofloxacina en suelo y alfalfa, provocó una reducción del 30,28 % en la masa aérea de alfalfa.

## Masa radicular

*Tabla 32: Anexo - resultados en masa radicular (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 2 | 7,3990 | 1,25724 | 0,88900 | -3,8968 | 18,6948 | 6,51 | 8,29 |
| DB (2 µg/L) | 3 | 2,2357 | 0,77818 | 0,44928 | 0,3026 | 4,1688 | 1,70 | 3,13 |
| DM (20 µg/L) | 3 | 2,8780 | 1,85281 | 1,06972 | -1,7246 | 7,4806 | 1,01 | 4,71 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 1,8697 | 0,78679 | 0,45425 | -0,0848 | 3,8242 | 1,38 | 2,78 |
| Total | 11 | 3,2498 | 2,33542 | 0,70416 | 1,6809 | 4,8188 | 1,01 | 8,29 |

Supuesto 01: Prueba de normalidad – la distribución de los residuales debe ser normal.

*Tabla 33: Anexo - prueba de normalidad - masa radicular (fuente propia)*

| | | **Pruebas de normalidad** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | Kolmogorov-Smirnov[a] | | | Shapiro-Wilk | | |
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Fresco - Masa Aérea(gr) | Testigo | 0,260 | 2 | . | - | - | - |
| | DB (2 µg/L) | 0,342 | 3 | . | 0,844 | 3 | 0,225 |
| | DM (20 µg/L) | 0,177 | 3 | . | 1,000 | 3 | 0,965 |
| | DA (200 µg/L) | 0,367 | 3 | . | 0,793 | 3 | 0,097 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Planteamiento de hipótesis:

Ho: los datos siguen una distribución normal

H1: los datos siguen una distribución diferente a la normal

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Shapiro-Wilk (se utiliza esta prueba debido a que la cantidad de datos son menores a 30 datos)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que los valores de significancia de la prueba estadística de Shapiro-Wilk 0.225, 0.965, 0.097 son mayores a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que los datos siguen una distribución normal.

Nota: la prueba de normalidad indica que, si los datos siguen una distribución normal, se podrá utilizar una prueba estadística paramétrica como el Análisis de Varianza (ANOVA).

Supuesto 02: Homocedasticidad que consiste en la homogeneidad de las varianzas

*Tabla 34: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - masa radicular*

| **Prueba de homogeneidad de varianzas** | | | |
|---|---|---|---|
| Fresco-Masa radicular | | | |
| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
| 0,798 | 3 | 7 | 0,533 |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre las varianzas

H1: si existe diferencia entre las varianzas

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Levene

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Levene 0.533 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre las varianzas.

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 35: Anexo - ANOVA - masa radicular (fuente propia)*

| **ANOVA de un factor** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Fresco-Masa radicular | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 43,646 | 3 | 14,549 | 9,347 | 0,008 |
| Intra-grupos | 10,896 | 7 | 1,557 | | |
| Total | 54,542 | 10 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.008 es menor a 0.05, entonces se rechaza la Ho y se concluye que al menos uno de los tratamientos es diferente.

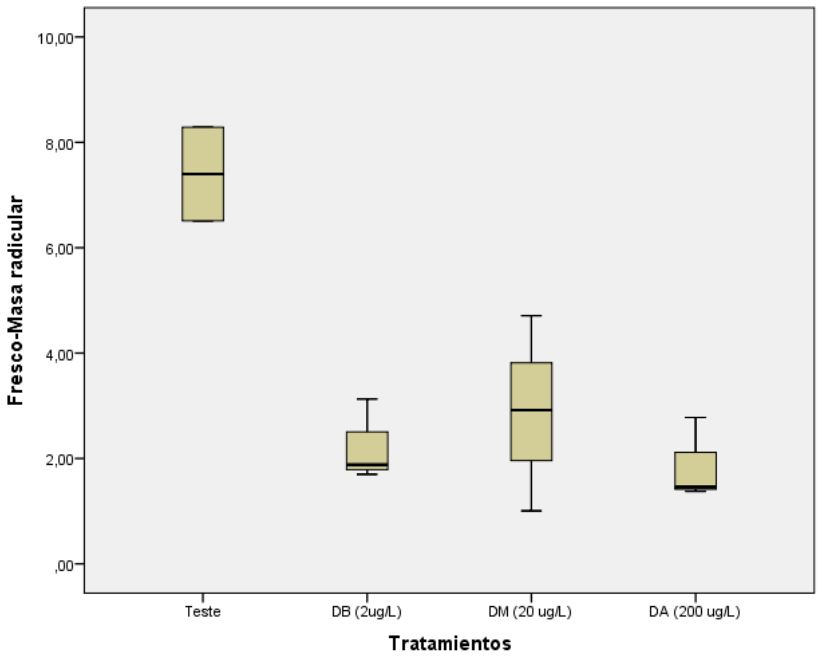



*Figura 44: Anexo - resultados de masa radicular (fuente propia)*

La figura 44 muestra una diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, sin embargo, se realizó una prueba posterior (Post Hoc) para verificar el contraste de las medias y

determinar que grupo de tratamiento se diferencia significativamente del grupo testigo.

**PRUEBAS DE POST HOC**

Para grupos homogéneos

*Tabla 36: Anexo, prueba post hoc - masa radicular*

| Fresco-Masa radicular | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | N | Subconjunto para-alfa = 0.05 | |
| | | | 1 | 2 |
| HSD de Tukey[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 1,8697 | |
| | DB (2 µg/L) | 3 | 2,2357 | |
| | DM (20 µg/L) | 3 | 26,8780 | |
| | Testigo | 2 | | 7,3990 |
| | Sig. | | 0,789 | 1,000 |
| Duncan[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 1,8697 | |
| | DB (2µg/L) | 3 | 2,2357 | |
| | DM (20 µg/L) | 3 | 2,8780 | |
| | Testigo | 2 | | 7,3990 |
| | Sig. | | 0,399 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,667.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Dado que existe al menos un tratamiento diferente al testigo, se aplicó la prueba Post Hoc para verificar que grupo de tratamiento es diferente, para ello se utilizó la prueba HSD de Tukey y la prueba de Duncan para comparar sus resultados de agrupación y verificar que subconjunto se adapta mejor a la figura 44.

- La prueba HSD de Tukey agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.

- La prueba Duncan agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.

Ambas pruebas indican que los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) se diferencian del grupo testigo. Cabe resaltar que la prueba de HSD de Tukey y la prueba de Duncan se utilizaron para brindar un mejor panorama y de tal forma, poder determinar que tratamiento se diferencia del testigo.

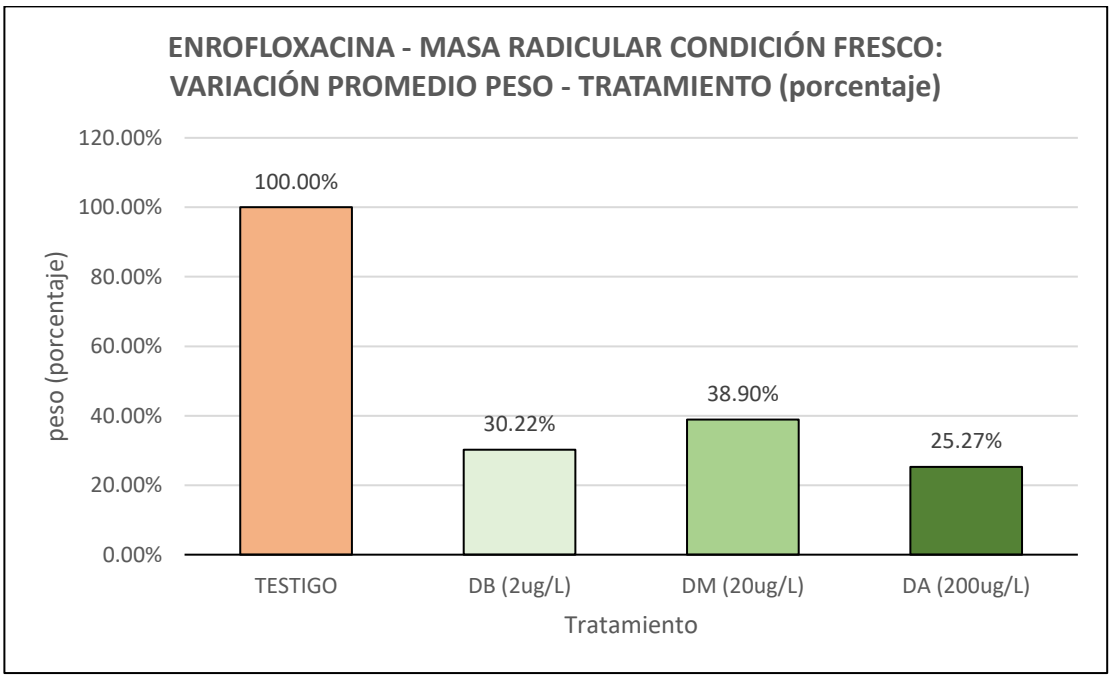



*Gráfico 3: Masa radicular (fuente propia)*

La aplicación de enrofloxacina en suelo y alfalfa, provocó una reducción del 68,53 % en la masa radicular de alfalfa.

## Masa aérea y radicular

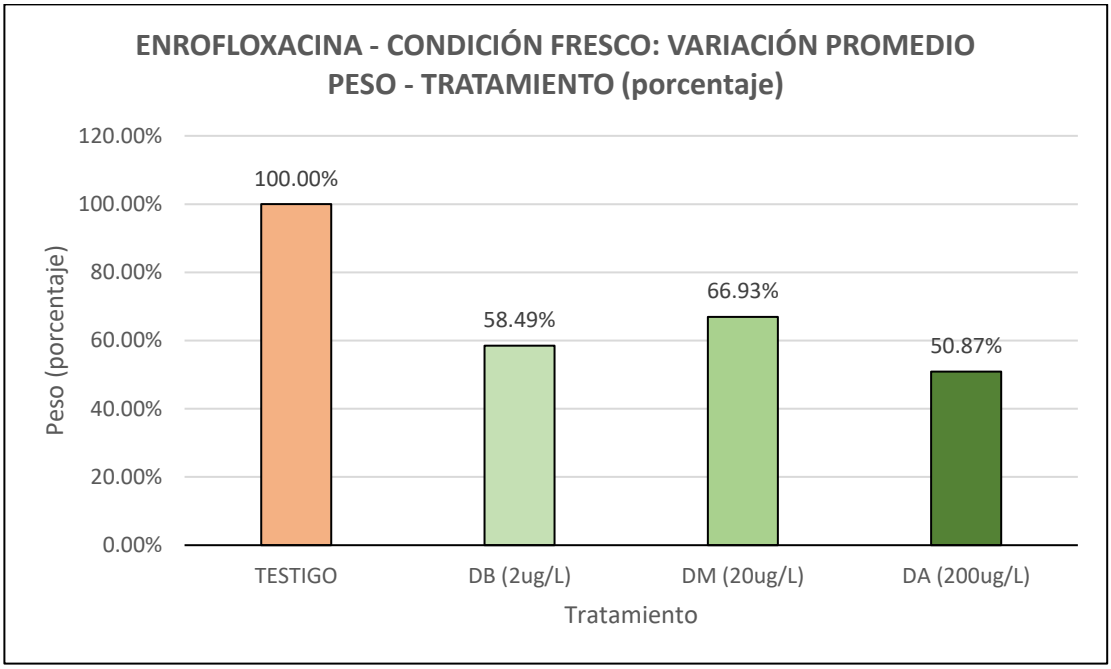



*Gráfico 4: masa aérea – radicular (fuente propia)*

La aplicación de enrofloxacina en suelo y alfalfa, provocó una reducción del 41,23 % en la masa aérea y radicular de alfalfa.

## Longitud de raíz

*Tabla 37: Anexo - resultados en longitud de raíz (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 40,5000 | 9,19239 | 6,50000 | -42,0903 | 123,0903 | 34,00 | 47,00 |
| DB (2µg/L) | 3 | 26,0000 | 2,00000 | 1,15470 | 21,0317 | 30,9683 | 24,00 | 28,00 |
| DM (20 µg/L) | 2 | 23,3333 | 0,57735 | 0,33333 | 21,8991 | 24,7676 | 23,00 | 24,00 |
| DA (200 µg/L) | 2 | 24,0000 | 1,73205 | 1,00000 | 19,6973 | 28,3027 | 22,00 | 25,00 |
| Total | 10 | 27,3636 | 7,29757 | 2,20030 | 22,4611 | 32,2662 | 22,00 | 47,00 |

Supuesto 01: Prueba de normalidad - la distribución de los residuales debe ser normal.

*Tabla 38: Anexo - prueba de normalidad - longitud de raíz (fuente propia)*

| | | **Pruebas de normalidad** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | Kolmogorov-Smirnov[a] | | | Shapiro-Wilk | | |
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Longitud de raíz | Testigo | 0,260 | 2 | . | - | - | - |
| | DB (2 µg/L) | 0,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| | DM (20 µg/L) | 0,385 | 3 | . | 0,750 | 3 | 0,000 |
| | DA (200 µg/L) | 0,385 | 3 | . | 0,750 | 3 | 0,000 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Planteamiento de hipótesis:

Ho: los datos siguen una distribución normal

H1: los datos siguen una distribución diferente a la normal

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Shapiro-Wilk (se utiliza esta prueba debido a que la cantidad de datos son menores a 30 datos)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Shapiro-Wilk 1.000 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que los datos siguen una distribución normal. Exceptuando DM y DA (20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) cuyos valores son 0.000, 0.000 y menores a 0.05, entonces se concluye que estos datos siguen una distribución diferente a la normal.

Nota: la prueba de normalidad indica que, si los datos siguen una distribución normal, se podrá utilizar una prueba estadística paramétrica como el Análisis de Varianza (ANOVA).

Supuesto 02: Homocedasticidad que consiste en la homogeneidad de las varianzas

*Tabla 39: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - longitud de raíz (fuente propia)*

| **Prueba de homogeneidad de varianzas** | | | |
|---|---|---|---|
| Longitud de raíz | | | |
| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
| 34,524 | 3 | 7 | 0,000 |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre las varianzas

H1: si existe diferencia entre las varianzas

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Levene

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Levene 0.000 es menor a 0.05, entonces se rechaza la Ho y se concluye que existe diferencia entre las varianzas.

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 40: Anexo - ANOVA - longitud de raíz (fuente propia)*

| ANOVA de un factor | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Longitud de raíz | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 433,379 | 3 | 144,460 | 10,197 | 0,006 |
| Intra-grupos | 99,167 | 7 | 14,167 | | |
| Total | 532,545 | 10 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.006 es menor a 0.05, entonces se rechaza la Ho y se concluye que al menos uno de los tratamientos es diferente.

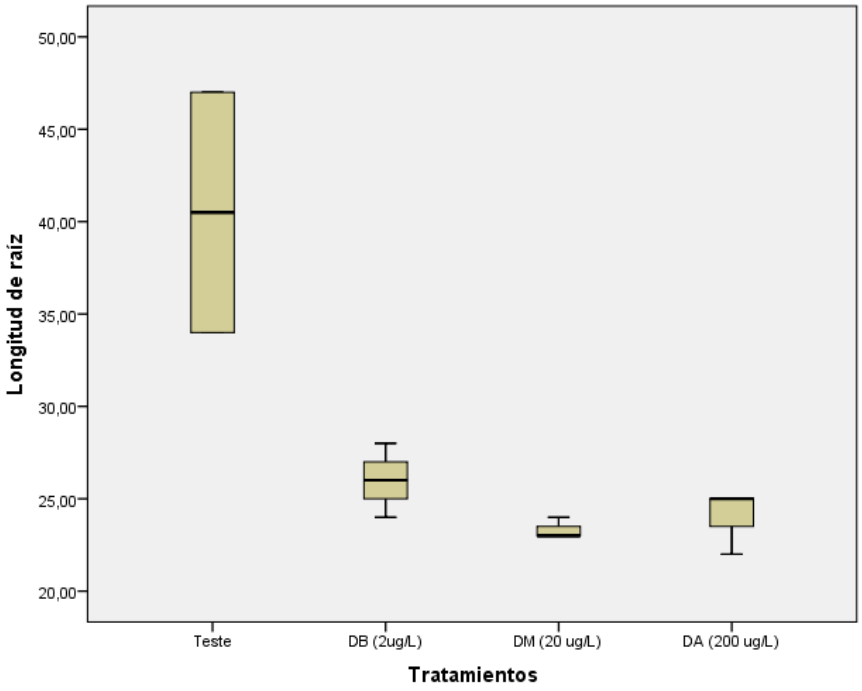



*Figura 45: Anexo - resultados de longitud de raíz (fuente propia)*

La figura 45 muestra una diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, sin embargo, se realizó una prueba posterior (Post Hoc) para verificar el contraste de las medias y determinar que grupo de tratamiento se diferencia significativamente del grupo testigo.

## PRUEBAS DE POST HOC

Para grupos homogéneos

*Tabla 41: Anexo - prueba post hoc - longitud de raíz (fuente propia)*

| Longitud de raíz | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | N | Subconjunto para-alfa = 0.05 | |
| | | | 1 | 2 |
| HSD de Tukey[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 23,3333 | |
| | DB (2 µg/L) | 3 | 24,0000 | |
| | DM (20 µg/L) | 3 | 26,0000 | |
| | Testigo | 2 | | 40,5000 |
| | Sig. | | 0,844 | 1,000 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Duncan[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 23,3333 | |
| | DB (2µg/L) | 3 | 24,0000 | |
| | DM (20 µg/L) | 3 | 26,0000 | |
| | Testigo | 2 | | 40,5000 |
| | Sig. | | 0,456 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,667.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Dado que existe al menos un tratamiento diferente al testigo, se aplicó la prueba Post Hoc para verificar que grupo de tratamiento es diferente, para ello se utilizó la prueba HSD de Tukey y la prueba de Duncan para comparar sus resultados de agrupación y verificar que subconjunto se adapta mejor a la figura 45.

- La prueba HSD de Tukey agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.

- La prueba Duncan agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y el Testigo en el subconjunto 2.

Ambas pruebas indican que los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) se diferencian del grupo testigo. Cabe resaltar que la prueba de HSD de Tukey y la prueba de Duncan se utilizaron para brindar un mejor panorama y de tal forma, poder determinar que tratamiento se diferencia del testigo.

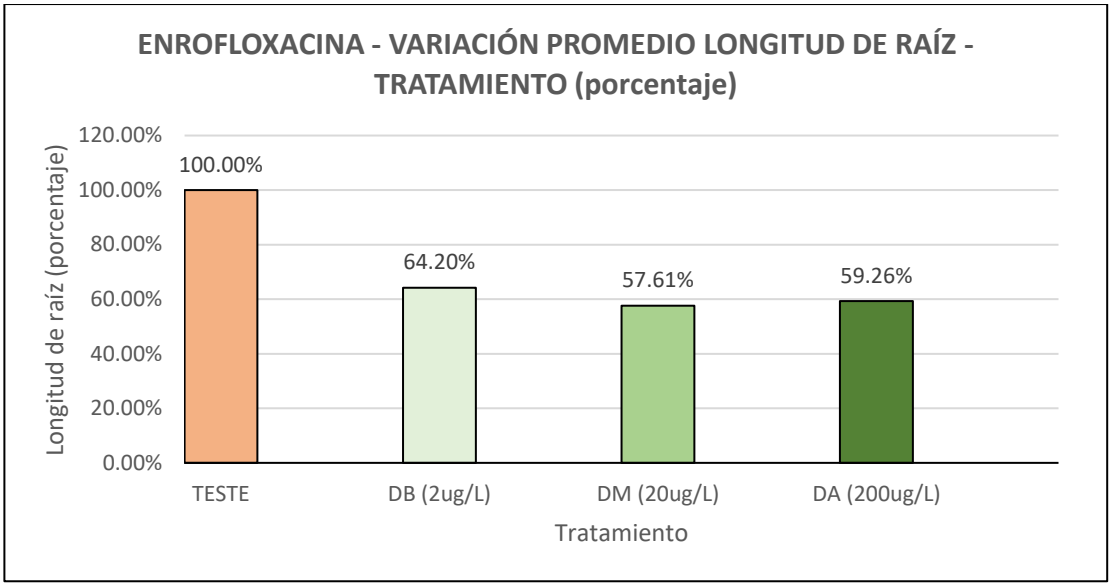



*Gráfico 5: longitud de raíz (fuente propia)*

La aplicación de enrofloxacina en suelo y alfalfa, provocó una reducción del 39,64 % en la longitud de raíz.

### Carbono total en alfalfa

### Carbono total en hojas

*Tabla 42: Anexo - resultados en carbono en hojas (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 426,8200 | 5,09129 | 2,93946 | 414,1725 | 439,4675 | 421,04 | 430,64 |
| DB (2µg/L) | 3 | 407,3567 | 11,01746 | 6,36093 | 379,9878 | 434,7256 | 397,59 | 419,30 |
| DM (20 µg/L) | 2 | 412,1850 | 11,29250 | 7,98500 | 310,7260 | 513,6440 | 404,20 | 420,17 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 400,6467 | 6,75803 | 3,90175 | 383,8588 | 417,4346 | 396,70 | 408,45 |
| Total | 11 | 411,7127 | 12,73934 | 3,84106 | 403,1543 | 420,2711 | 396,70 | 430,64 |

Supuesto 01: Prueba de normalidad - la distribución de los residuales debe ser normal.

*Tabla 43: Anexo - prueba de normalidad - carbono en hojas (fuente propia)*

| | | Pruebas de normalidad | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | Kolmogorov-Smirnov[a] | | | Shapiro-Wilk | | |
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Hojas - Carbono | Testigo | 0,317 | 3 | . | 0,889 | 3 | 0,351 |
| | DB (2 µg/L) | 0,245 | 3 | . | 0,971 | 3 | 0,672 |
| | DM (20 µg/L) | 0,260 | 2 | . | | | |
| | DA (200 µg/L) | 0,383 | 3 | . | 0,756 | 3 | 0,013 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Planteamiento de hipótesis:

Ho: los datos siguen una distribución normal

H1: los datos siguen una distribución diferente a la normal

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Shapiro-Wilk (se utiliza esta prueba debido a que la cantidad de datos son menores a 30 datos)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que los valores de significancia de la prueba estadística de Shapiro-Wilk 0.351, 0.672 son mayores a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que los datos siguen una distribución normal. Exceptuando DA (200 µg $L^{-1}$) cuyo valor es 0.013 y menor a 0.05, entonces se concluye que este dato sigue una distribución diferente a la normal.

Nota: la prueba de normalidad indica que, si los datos siguen una distribución normal, se podrá utilizar una prueba estadística paramétrica como el Análisis de Varianza (ANOVA).

Supuesto 02: Homocedasticidad que consiste en la homogeneidad de las varianzas

*Tabla 44: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - carbono en hojas (fuente propia)*

| **Prueba de homogeneidad de varianzas** | | | |
|---|---|---|---|
| Hojas - Carbono | | | |
| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
| 1,169 | 3 | 7 | 0,387 |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre las varianzas

H1: si existe diferencia entre las varianzas

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Levene

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Levene 0.387 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre las varianzas.

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 45: Anexo - ANOVA - carbono en hojas (fuente propia)*

| ANOVA de un factor<br>Hojas - Carbono | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 1109,434 | 3 | 369,811 | 5,042 | 0,036 |
| Intra-grupos | 513,474 | 7 | 73,353 | | |
| Total | 1622,908 | 10 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.036 es menor a 0.05, entonces se rechaza la Ho y se concluye que al menos uno de los tratamientos es diferente.

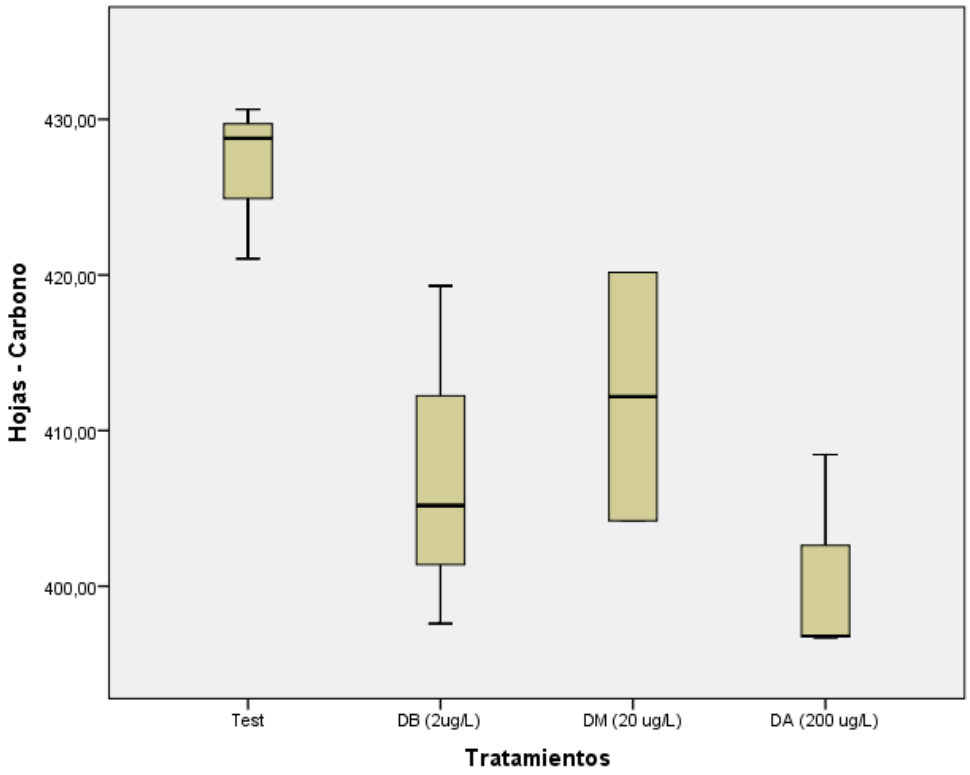



*Figura 46: Anexo - resultados de carbono en hojas (fuente propia)*

La figura 46 muestra una diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, sin embargo, se realizó una prueba posterior (Post Hoc) para verificar el contraste de las medias y determinar que grupo de tratamiento se diferencia significativamente del grupo testigo.

## PRUEBAS DE POST HOC

Para grupos homogéneos

*Tabla 46: Anexo - prueba post hoc - carbono en hojas (fuente propia)*

| Hojas - Carbono | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | N | Subconjunto para-alfa = 0.05 | |
| | | | 1 | 2 |
| HSD de Tukey[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 400,6467 | |
| | DB (2 µg/L) | 3 | 407,3567 | 407,3567 |
| | DM (20 µg/L) | 2 | 412,1850 | 412,1850 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Testigo | 3 | | 426,8200 |
| | Sig. | | 0,458 | 0,123 |
| Duncan[a,b] | DA (200 µg/L) | 3 | 400,6467 | |
| | DB (2µg/L) | 3 | 407,3567 | |
| | DM (20 µg/L) | 2 | 412,1850 | 412,1850 |
| | Testigo | 3 | | 426,8200 |
| | Sig. | | 0,178 | 0,089 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,667.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Dado que existe al menos un tratamiento diferente al testigo, se aplicó la prueba Post Hoc para verificar que grupo de tratamiento es diferente, para ello se utilizó la prueba HSD de Tukey y la prueba de Duncan para comparar sus resultados de agrupación y verificar que subconjunto se adapta mejor a la figura 46.

- La prueba HSD de Tukey agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y en el subconjunto 2 se agrupan los tratamientos DB, DM y Testigo.

- La prueba Duncan agrupa los tratamientos de DB, DM y DA en el subconjunto 1 y en el subconjunto 2 se agrupan los tratamientos DM y testigo.

Para Tukey, el subconjunto 1 agrupa a los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) diferenciándolos del grupo testigo sin embargo, en el subconjunto 2 agrupa los tratamientos DB, DM y el testigo, esto indica que para la prueba de Tukey estos tratamientos pueden ser similares ya que sus rangos mínimos y máximos están próximos (figura 46); haciendo un contraste con la figura 46, se aprecia que no guarda similitud ya que para determinar que tratamiento se diferencia del testigo, las medias deben estar alejadas de la barra que corresponde al grupo testigo mostrado en el gráfico, por lo que la prueba de Tukey para este caso no explica la diferencia entre los tratamientos del subconjunto 2.

Para Duncan, el subconjunto 1 agrupa a los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) diferenciándolos del grupo testigo, sin embargo, en el subconjunto 2 agrupa los tratamientos DM y testigo, esto indica que para la prueba de Duncan estos tratamientos pueden ser similares ya que sus rangos mínimos y máximos están próximos (figura 46); haciendo un contraste con la figura 46, se aprecia que guarda similitud ya que para determinar que tratamiento se diferencia del testigo, las medias deben estar alejadas de la barra que corresponde al grupo testigo mostrado en el gráfico. La prueba de Duncan al ser una prueba que compara las medias de los tratamientos, se aproxima mejor a lo mostrado en la figura 46 e indica que los tratamientos DB y DA se diferencian con el grupo testigo, en contraste con la prueba de Tukey que indica solamente un tratamiento diferente al testigo. Cabe resaltar que la prueba de HSD de Tukey y la prueba de Duncan se utilizaron para brindar un mejor panorama y de tal forma, poder determinar que tratamiento se diferencia del testigo.

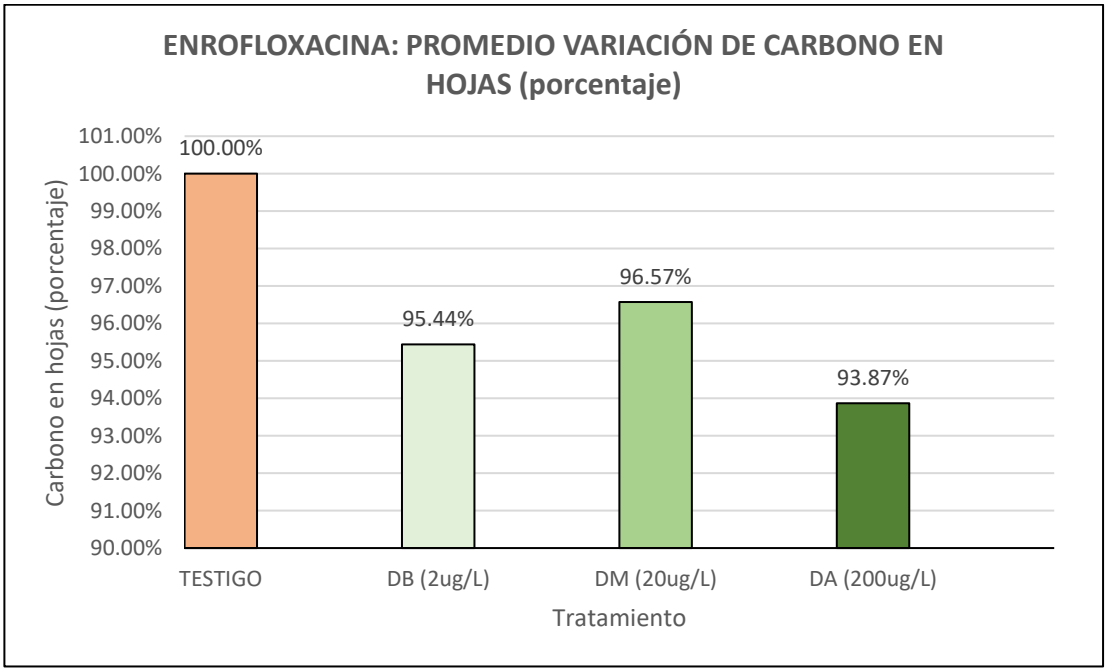



*Gráfico 6: Cantidad de carbono en hojas (fuente propia)*

La aplicación de enrofloxacina en suelo y alfalfa, provocó una reducción del 4,70 % de carbono en hojas de alfalfa.

## Carbono total en raíz

*Tabla 47: Anexo - resultados de carbono total en raíz (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 272,9700 | 41,91500 | 24,19964 | 168,8474 | 377,0926 | 236,58 | 318,80 |
| DB (2 µg/L) | 3 | 221,6633 | 28,25705 | 16,31422 | 151,4689 | 291,8577 | 193,99 | 250,47 |
| DM (20 µg/L) | 3 | 219,6700 | 60,45113 | 34,90147 | 69,5011 | 369,8389 | 183,23 | 289,45 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 201,8733 | 45,55450 | 26,30090 | 88,7097 | 315,0370 | 159,92 | 250,33 |
| Total | 12 | 229,0442 | 47,67314 | 13,76205 | 198,7541 | 259,3342 | 159,92 | 318,80 |

Supuesto 01: Prueba de normalidad - la distribución de los residuales debe ser normal.

*Tabla 48: Anexo - prueba de normalidad - carbono en raíz (fuente propia)*

| | | **Pruebas de normalidad** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | Kolmogorov-Smirnov[a] | | | Shapiro-Wilk | | |
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Raíz - Carbono | Testigo | 0,256 | 3 | . | 0,962 | 3 | 0,625 |
| | DB (2 µg/L) | 0,183 | 3 | . | 0,999 | 3 | 0,934 |
| | DM (20 µg/L) | 0,376 | 3 | . | 0,772 | 3 | 0,049 |
| | DA (200 µg/L) | 0,223 | 3 | . | 0,985 | 3 | 0,763 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Planteamiento de hipótesis:

Ho: los datos siguen una distribución normal

H1: los datos siguen una distribución diferente a la normal

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Shapiro-Wilk (se utiliza esta prueba debido a que la cantidad de datos son menores a 30 datos)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que los valores de significancia de la prueba estadística de Shapiro-Wilk 0.625, 0.934, 0.763 son mayores a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que los datos siguen una distribución normal. Exceptuando DM (20 µg $L^{-1}$) cuyo valor es 0.049 y menor a 0.05, entonces se concluye que este dato sigue una distribución diferente a la normal.

Nota: la prueba de normalidad indica que, si los datos siguen una distribución normal, se podrá utilizar una prueba estadística paramétrica como el Análisis de Varianza (ANOVA).

Supuesto 02: Homocedasticidad que consiste en la homogeneidad de las varianzas

*Tabla 49: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - carbono en raíz (fuente propia)*

| **Prueba de homogeneidad de varianzas** Raíz - Carbono | | | |
|---|---|---|---|
| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
| 0,991 | 3 | 8 | 0,445 |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre las varianzas

H1: si existe diferencia entre las varianzas

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Levene

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Levene 0.445 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre las varianzas.

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 50: Anexo - ANOVA - carbono en raíz (fuente propia)*

| ANOVA de un factor | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Raiz - Carbono | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 8430,254 | 3 | 2810,085 | 1,357 | 0,323 |
| Intra-grupos | 16569,758 | 8 | 2071,220 | | |
| Total | 25000,012 | 11 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.323 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre los tratamientos.

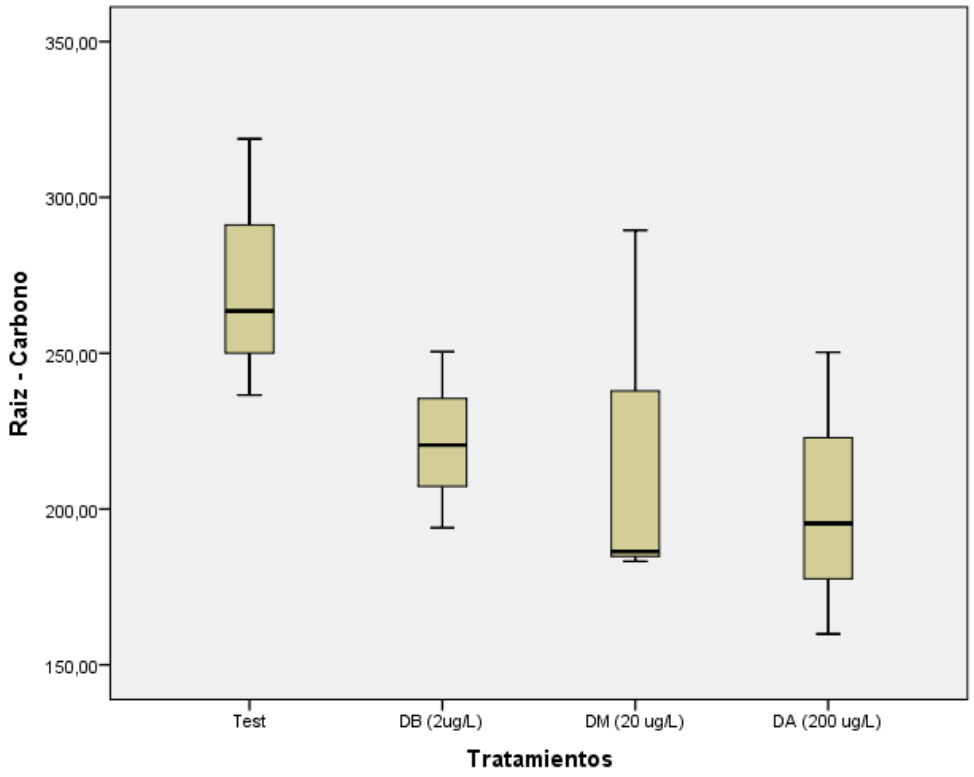



*Figura 47: Anexo - resultados de carbono en raíz (fuente propia)*

La figura 47 muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, a pesar de que las medias de los tratamientos (DB, DM y DA) no se encuentran dentro de los rangos mínimos y máximos del grupo testigo, existe una alineación entre los rengos máximos de los tratamientos y la barra testigo que muestra el gráfico de la figura 47, esto indica que no existe una diferencia significativa y por ello, no se requiere realizar una prueba posterior (Post Hoc).

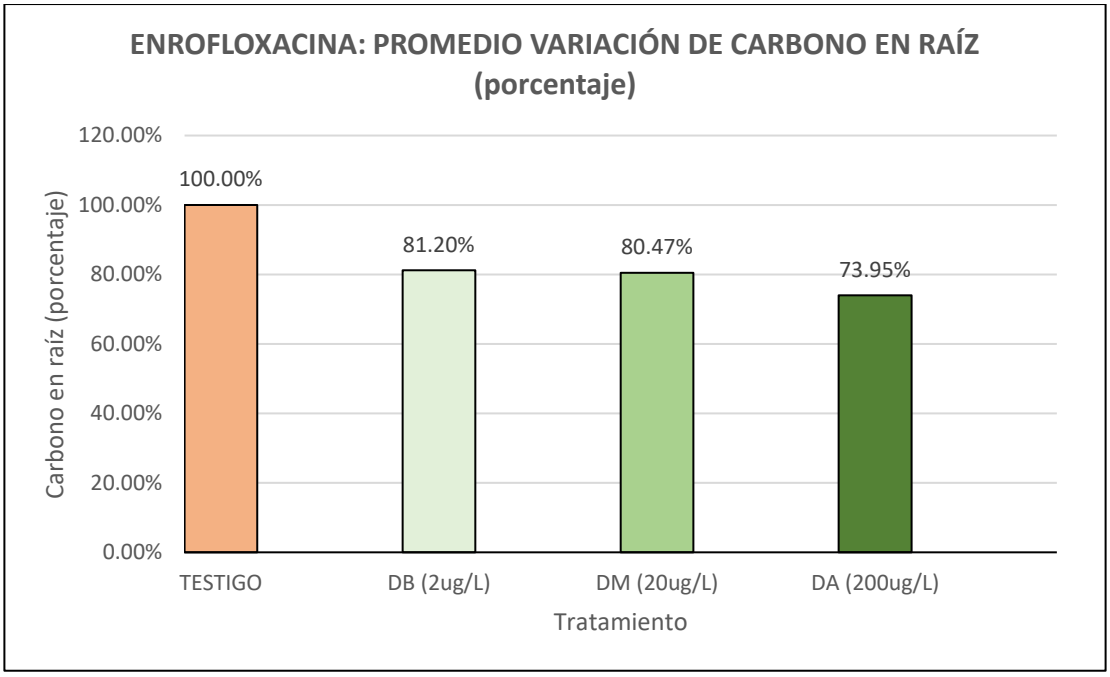



*Gráfico 7: Cantidad de carbono de raíz (fuente propia)*

La aplicación de enrofloxacina en suelo y alfalfa, provocó una reducción del 21,46 % de carbono en raíz de alfalfa.

**Carbono total en hojas y raíz**

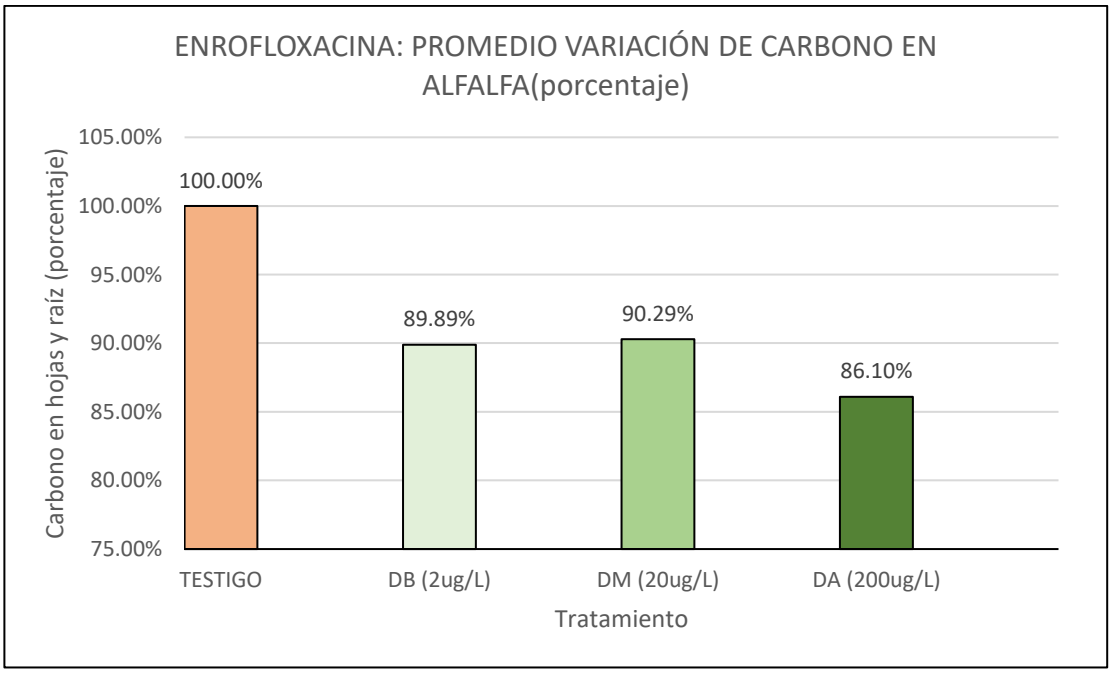



*Gráfico 8: Cantidad de carbono en hojas – raíz (fuente propia)*

La aplicación de enrofloxacina en suelo y alfalfa, provocó una reducción del 11,24 % en la hojas y raíz de alfalfa.

**Nitrógeno acumulado en suelo**

*Tabla 51: Anexo - resultado de nitrógeno en suelo (fuente propia)*

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Testigo | 3 | 1,7900 | 0,35553 | 0,20526 | 0,9068 | 2,6732 | 1,51 | 2,19 |
| DB (2 µg/L) | 3 | 1,9700 | 0,11136 | 0,06429 | 1,6934 | 2,2466 | 1,85 | 2,07 |
| DM (20 µg/L) | 3 | 1,9367 | 0,26858 | 0,15506 | 1,2695 | 2,6038 | 1,63 | 2,13 |
| DA (200 µg/L) | 3 | 2,0333 | 0,29670 | 0,17130 | 1,2963 | 2,7704 | 1,72 | 2,31 |
| Total | 12 | 1,9325 | 0,25111 | 0,07249 | 1,7730 | 2,0920 | 1,51 | 2,31 |

Supuesto 01: Prueba de normalidad - la distribución de los residuales debe ser normal.

*Tabla 52: Anexo - prueba de normalidad - nitrógeno en suelo (fuente propia)*

| | | **Pruebas de normalidad** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tratamientos | Kolmogorov-Smirnov[a] | | | Shapiro-Wilk | | |
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Suelo - Nitrógeno | Testigo | 0,299 | 3 | . | 0,915 | 3 | 0,433 |
| | DB (2 µg/L) | 0,238 | 3 | . | 0,976 | 3 | 0,702 |
| | DM (20 µg/L) | 0,330 | 3 | . | 0,866 | 3 | 0,286 |
| | DA (200 µg/L) | 0,216 | 3 | . | 0,989 | 3 | 0,795 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Planteamiento de hipótesis:

Ho: los datos siguen una distribución normal

H1: los datos siguen una distribución diferente a la normal

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Shapiro-Wilk (se utiliza esta prueba debido a que la cantidad de datos son menores a 30 datos)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que los valores de significancia de la prueba estadística de Shapiro-Wilk 0.433, 0.702, 0.286, 0.795 son mayores a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que los datos siguen una distribución normal.

Nota: la prueba de normalidad indica que, si los datos siguen una distribución normal, se podrá utilizar una prueba estadística paramétrica como el Análisis de Varianza (ANOVA).

Supuesto 02: Homocedasticidad que consiste en la homogeneidad de las varianzas

*Tabla 53: Anexo - prueba de homogeneidad de varianzas - (fuente propia)*

| **Prueba de homogeneidad de varianzas** | | | |
|---|---|---|---|
| Suelo - Nitrógeno | | | |
| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
| 1,360 | 3 | 8 | 0,323 |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre las varianzas

H1: si existe diferencia entre las varianzas

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Levene

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Levene 0.323 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre las varianzas.

Análisis de Varianza (ANOVA)

*Tabla 54: Anexo - ANOVA - nitrógeno en suelo (fuente propia)*

**ANOVA de un factor**

Suelo - Nitrógeno

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Inter-grupos | 0,096 | 3 | 0,032 | 0,427 | 0,739 |
| Intra-grupos | 0,598 | 8 | 0,075 | | |
| Total | 0,694 | 11 | | | |
| Total | 461050,500 | 9 | | | |

Planteamiento de hipótesis:

Ho: no existe diferencia entre los tratamientos

H1: al menos uno de los tratamientos es diferente

Nivel de significancia: 0.05 = 5%

Prueba estadística: Fisher (F)

Criterios de decisión:

Si P-value es menor al alfa (0.05), se rechaza la Ho y se acepta la H1

Conclusión estadística:

Dado que el valor de significancia de la prueba estadística de Fisher (F) 0.739 es mayor a 0.05, entonces no se rechaza la Ho y se concluye que no existe diferencia entre los tratamientos.

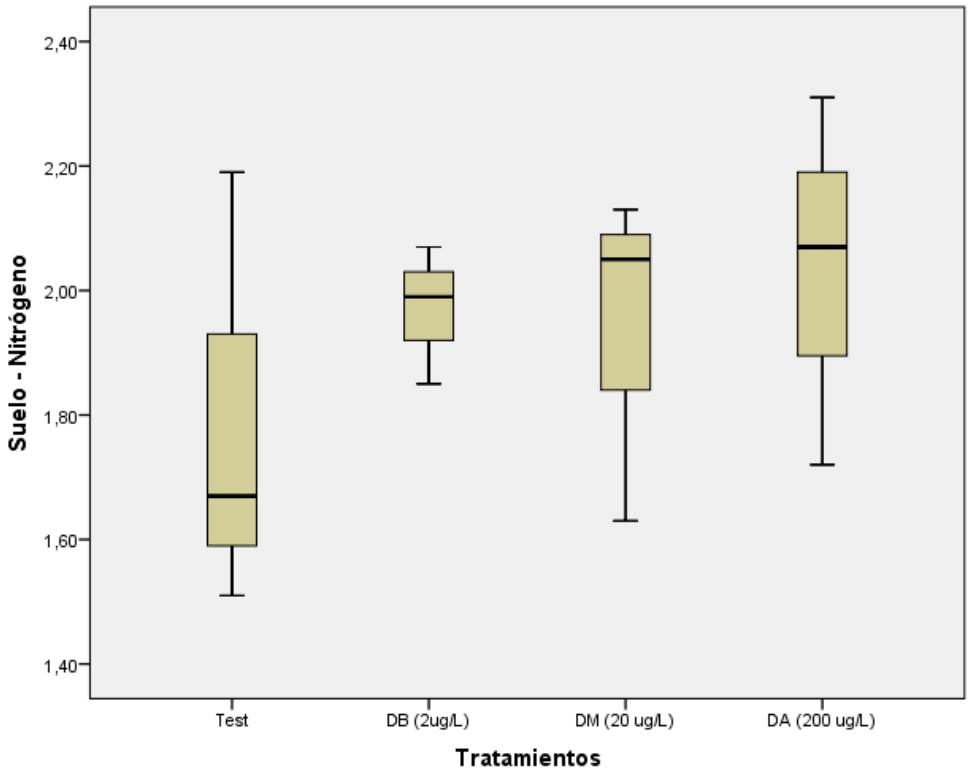



*Figura 48: Anexo - resultados de nitrógeno en suelo (fuente propia)*

La figura 48 muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos DB, DM y DA (2, 20 y 200 µg $L^{-1}$ respectivamente) con respecto al grupo testigo, ya que los valores de las medias se encuentran dentro de los rangos mínimos y máximos de la barra testigo que se muestra en el gráfico de la figura 48, esto indica que no se requiere realizar una prueba posterior (Post Hoc).

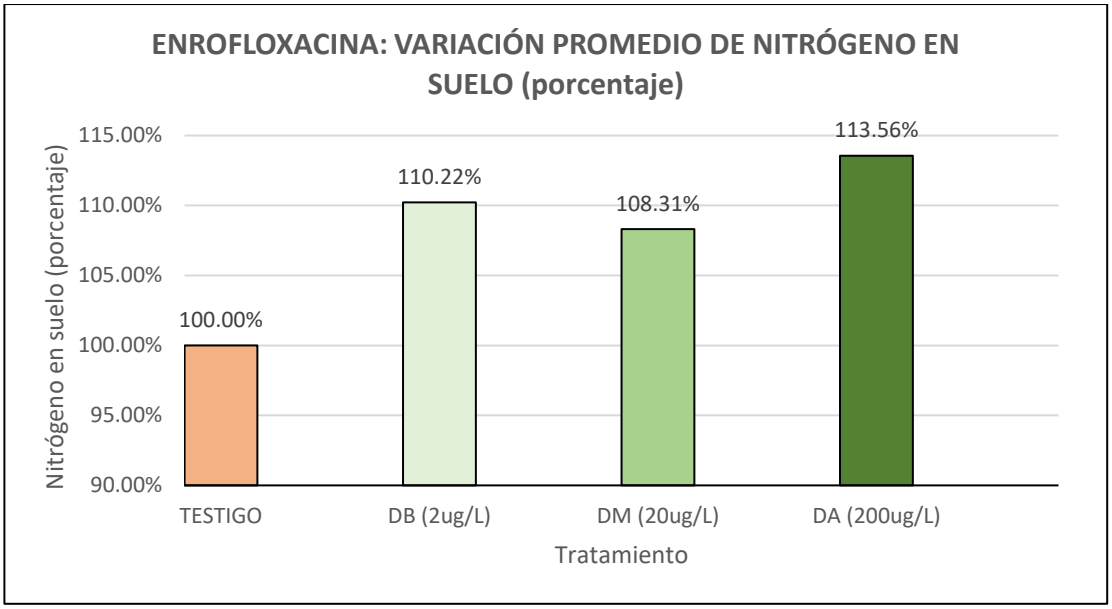



*Gráfico 9: nitrógeno en suelo (fuente propia)*

La aplicación de enrofloxacina en suelo, no tuvo efecto de reducción de nitrógeno en suelo.

"UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

# FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL UNAM

Formulario de autorización para la publicación electrónica en la página web del Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Moquegua, de conformidad con la Ley N° 30035 Ley que regula el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto y Resolución de Comisión Organizadora N° 041-2022-UNAM que aprueba el Reglamento que regula el Repositorio Institucional Digital de la UNAM.

## 1. DATOS DEL AUTOR

Nombres y Apellidos : Oscar Duberlv Vera Loavza
DNI/Carnet de Extranjería/Pasaporte N° : 46540035
Correo electrónico : duberly_vl@hotmail.com
Teléfono/Celular : 935 201 274

## 2. GRADO, TITULO O ESPECIALIZACIÓN (Marque con una X)

| Bachiller | Título Profesional | Magister | Doctor | Segunda Especialidad |
|---|---|---|---|---|
| | X | | | |

## 3. TIPO DE PUBLICACIÓN (Marque con una X)

a) Articulo ( )
b) Tesis de pregrado ( **X**)
c) Tesis de Maestría ( )
d) Tesis de Doctorado ( )
e) Monografía ( )
f) Reporte de caso científico o hallazgos ( )
g) Libro ( )
h) Parte de un libro ( )
i) Revisión ( )
j) Conferencia ( )
k) Presentación ( )
l) Artículo preliminar ( )
m) Articulo antes de ser publicado ( )
n) Artículo de prensa ( )
o) Documentos internos ( )
p) Imagen ( )
q) Documentos técnicos ( )
r) Ponencias presentadas en eventos científicos (Jornada, Congreso, Simposio Conferencias, etc.) ( )
s) Informes de suficiencia profesional ( )
t) Patentes producidas por académicos/as ( )

**4. TIPO DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (Marque con una X)**

a) Tesis **( X )**
b) Trabajo de Investigación **( )**
c) Trabajo de suficiencia profesional **( )**
d) Trabajo académico **( )**

**5. DATOS DE LA PUBLICACION**

a) Título : EFECTO DEL RESIDUO DE ENROFLOXACINA EN EL CULTIVO DE ALFALFA (*Medicago sativa*) Y EN EL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN SUELO
b) Campo del conocimiento OCDE (Indicar el código de clasificación OCDE de la obra : https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html) : 2.07.00
c) Fecha de publicación : 2022

**6. DATOS DEL ASESOR:**

a) Nombres y Apellidos : Franz Zirena Vilca
b) DNI/Pasaporte/Cédula : 01341834
c) ORCID : 0000-0002-4534-0733

**FIRMA** : .....

**DOCUMENTO DE IDENTIDAD** : 46540035
**NOMBRES Y APELLIDOS** : Oscar Duberly Vera Loayza

# "UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

## LICENCIAS

Licencia Estándar

Bajo los siguientes términos, autorizo el depósito de mi trabajo de investigación en el Repositorio Institucional Digital de la UNAM.

Con la autorización de depósito da mi trabajo de investigación, otorgo a la Universidad Nacional de Moquegua, una Licencia No Exclusiva para reproducir. distribuir, comunicar al público, transformar (únicamente mediante su traducción a otros idiomas) y poner a disposición del público mi trabajo de investigación (incluido el resumen), en formato físico o digital, en cualquier medio, conocido o por conocerse, a través de los diversos servicios provistos por la Universidad, creados o por crearse, tales como el Repositorio Institucional Digital de la UNAM, Colección de Tesis, entre otros, en el Perú y en el extranjero, por el tiempo y veces que considere necesarias, y libre de remuneraciones.

En virtud de dicha Licencia, la UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA, podrá reproducir mi trabajo de investigación en cualquier tipo de soporte y en más de un ejemplar, sin modificar su contenido, solo con los propósitos de seguridad, respaldo y preservación.

Declaro que el trabajo de investigación es una creación de mi autoría y exclusiva titularidad, o coautoría con titularidad compartida, y me encuentro facultado a conceder la presente licencia y, asimismo, garantizo que dicho trabajo de investigación no infringe derechos de autor de terceras personas.

La UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA consignara el nombre del/los autor/es del trabajo de investigación, y no le hará ninguna modificación más de la permitida en la presente licencia.

Autorizo el depósito (marque con una X).

( X ) **SI autorizo que se deposite inmediatamente.**

**FIRMA** : .....

**DOCUMENTO DE IDENTIDAD** : 46540035

**NOMBRES Y APELLIDOS** : Oscar Duberly Vera Loayza

**FECHA** : 09/09/2022

